

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON

PLASTICIDADE OSMORREGULATÓRIA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E O USO DE ESTUÁRIOS COMO PONTE DE DISPERSÃO DE PEIXES EURIHALINOS

CURITIBA

2012

FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON

PLASTICIDADE OSMORREGULATÓRIA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E O USO DE ESTUÁRIOS COMO PONTE DE DISPERSÃO DE PEIXES EURIHALINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Área de Concentração em Fisiologia Comparada, Departamento de Ciências Fisiológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

Àquele que concebeu a experiência da vida terrena, nela implantando provas, obstáculos e percalços que galgaram degraus em minha atual expiação. Que me permitiu atentar que a vida não é um romance finito; que nós somos os principais redatores de nossa própria existência; e que os momentos difíceis e os abalos devem ser agradecidos, pois a partir deles observaremos as situações agraciadas com maior enlevo.

Aos que me permitiram engajar nesta fascinante dádiva, contribuindo na formação de valores e princípios que caracterizam parte de meu caráter. Obrigada pelos períodos de tolerância, por aceitarem minha forma de ser e de pensar, sem reprimi-la por isso. Mãe, obrigada pela paciência nos momentos que necessitei de seus cuidados, pela comida sempre bem posta, e muuuito gostosa, pelo papel materno sempre bem desempenhado. Pai, obrigada por me dar as condições ideais para trilhar este caminho escolhido. Perdoem-me se os fiz tristes junto a mim nos em minhas horas de mazela...nunca foi a intenção.

Ao meu irmão Ricardo (grêmio, grêmio ê!), minha irmã Gisele (top), meus sobrinhos Ruan, Kauã e Leonardo (pode aumentar a lista, mas como AMO vocês!), minha cunhada Viviane (a maquiadora), meu cunhado Marcelo (huum feijoada!)...pouco partilhamos deste meu dia a dia mas nossos momentos de convivência foram essenciais para meu crescimento pessoal, que influencia nos resultados dos outros campos de nossa vida. Pensamos diferente, mas isso que nos torna familiares, e iguais como seres humanos.

À professora Carolina Arruda Freire, minha orientadora não apenas profissional. Obrigada pelo tempo disponível em ouvir meus desabafos, em segurar minha mão e me lembrar da tranquilidade. Obrigada pela paciência em me dar os mesmos sermões diversas vezes, sem optar por ser ríspida, mesmo quando eu escutava, mas não ouvia. Obrigada pela confiança que depositou a minha pessoa, muito obrigada. Espero que este seja um dos primeiros frutos que possa ser ofertado como minha retribuição deste contexto todo.

Ao Programa Capes Reuni por conceder a bolsa, sem a qual não seria possível realizar o trabalho com a dedicação esperada.

Às professoras Viviane, Marisa, Ana Lúcia, Fabíola e Ana Tereza (Universidade Positivo); aos professores Ricardo Fernandez, Jean Ricardo Simões Vitule, Alfredo Marques (Departamento de Química da UFPR), Gilson Volpato (UNESP) e Luiz Cláudio Fernandes, em especial ao professor Paulo Lana (CEM/PR), por mesmo não envolvidos diretamente, concederem parte de seus atribulados tempo e afazeres para me elucidarem, me fornecerem informações, sugestões, reagentes e/ou equipamentos.

Aos demais mestres do conhecimento de nosso programa, professores Renato R. Ventura, Rosalvo T. H. Fogaça, Ilana K. Silva, Carlos E. Nolf Damiani, Ana Lúcia Tararthuch, Anita Nishiyama, Anderson J. M. Andrade e Luana Fischer, por produzirem uma ampliação na capacidade reflexiva de minha mente (mesmo com disciplinas por vezes fora da linha de pesquisa de meu projeto), indo além do que contam os livros.

Novamente ao professor Ricardo, à Priscilla e ao Fernando, por serem tão pacientes em me explicar, e explicar e explicar (com repetição proposital) um dito ensaio desta dissertação.

Aos antigos, novos e futuros parceiros de estrada, que muitas vezes fizeram papel de pai/mãe e irmão mais velho, me ensinando, me direcionando e partilhando lágrimas e gargalhadas (aliás, tolerando a minha risada...matrix e sem som, ok...). Agradeço a oportunidade de ter cruzado com verdadeiros guias. Muitos só passaram para deixar alguma palavra e se foram, muitos ainda irão, mas muitos ainda virão e maior ainda o número daqueles que ficarão comigo, mesmo longe.

À Glaucia (mãe), Andressa, Marcos, Giovanna, Natascha, Luciana, Enelise, Priscilla, João, Anieli, Silvia, Mauro, Claudia...temos afinidades diferentes, mas sintonias equivalentes. MUITO obrigada pelos apoios, pelos consolos, pelas críticas, pelas ajudas, mas principalmente pelas risadas! Vocês foram os principais ingredientes para meu novo produto humano. À Fabíola e a Wan (mães dois), pela confiança e oportunidade de tornar minha nova família mais próxima. À Betina, Dabna, Anna, Adriana, Júlia, Bruno, Marco, Fabrício e os demais dos corredores alheios rs, podemos não ser tão próximos, mas sempre estar em suas companhias me foi indescritivelmente agradável. Somos da mesma turma! À Mariana, Sacha, May, Ale, Chico, André, Simon...sempre presentes, mesmo quando ausentes!

Aos meus romances, com os quais aprendi muito...não foram a metade da minha laranja, mas me somaram aprendizados insubstituíveis.

Curiosamente e finalmente, a mim...sim, aprendi muito comigo, e se cheguei até aqui, soube de certa forma lidar com meus impasses. Muito ainda tenho que trilhar, mas já caminhei com meus pequenos passos.

*“Ando devagar, porque já tive pressa
e levo esse sorriso, porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte,
mais feliz quem sabe
só levo a certeza, de que muito pouco eu sei
e nada sei...”*

(Tocando em Frente – Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

A tilápia do Nilo é uma das mais importantes espécies utilizadas na aquicultura mundialmente, e também no Brasil. A família a que pertence é a dos ciclídeos, recentes re-invasores do ambiente dulcícola e por isso notoriamente eurihalinos. Seu cultivo em tanques-rede aumenta as chances de escape para o ambiente. Quando cultivada próxima a estuários e sendo eurihalina, pode facilmente se espalhar para bacias vizinhas. Apesar do conhecimento já disponível sobre a eurihalinidade da tilápia do Nilo, protocolos de exposição abrupta são úteis para se testar os limites das espécies, no caso, diante do aumento de salinidade. A adaptação rápida ao excesso de sal na água envolve a modulação da atividade de enzimas osmorregulatórias, como a anidrase carbônica (AC) e Na^+, K^+ -ATPase (NAK) das brânquias e rins. Contribuindo para o conhecimento dos mecanismos responsáveis pela eurihalinidade de teleósteos de água doce, em particular dos ciclídeos, avaliou-se a manutenção da homeostasia osmótica e iônica extracelular e hidratação tecidual e a atividade da AC e NAK branquial e renal diante de aumento abrupto de salinidade. As tilápias (9-13cm) foram adquiridas de piscicultura (Araucária) e transportadas para o laboratório (Curitiba). Após aclimação (5 dias), foram colocadas em aquários de 12 litros (20°C), (n=3). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os espécimes (n = 9) foram submetidos por 6, 12 ou 24 horas às salinidades de 0 (água doce, AD, controle), 10, 20, 30, 35 e 40‰. Os peixes foram então anestesiados e foi coletada amostra de sangue para as dosagens plasmáticas (osmolalidade, sódio, potássio, cloreto e magnésio). Uma amostra de músculo foi retirada para determinação do conteúdo de água tecidual (% do peso úmido). Nos tecidos branquial e renal foram feitas as análises de atividades enzimáticas: AC pela taxa de queda de pH com o tempo, e NAK pela geração de ADP sensível à ouabaína (5mM). Estatística: ANOVA de uma via e testes-t de Student (salinidade e tempo). A tolerância máxima da tilápia foi de 9 horas em 30‰, 7 horas em 35‰ e 5 horas em 40‰. A osmolalidade plasmática em água doce (252±12 mOsm/kg de H_2O) aumentou para >350 mOsm/kg de H_2O acima de 20‰. Em paralelo, o teor hídrico muscular reduziu-se de 79±0,6% em água doce para <76% em salinidades acima de 20‰. O sódio se manteve regulado. O cloreto (AD: 118±7 mM) teve seus picos de concentração observados em 35‰ 6 horas (264±24 mM) e 30‰ 12 horas (216±18 mM). O potássio (AD: 4±0,5 mM) aumentou a partir de 6 horas em salinidades maiores que 20‰, assim como o magnésio (AD: 0,9±0,08 mM). A AC branquial reduziu sua atividade de 20±3mg de ptn em AD (6 horas) para 7±2mg de ptn em 30‰. A atividade da NAK renal (~9±2 nmol ADP/μg proteína.h) foi superior à branquial (~2±1nmol ADP/μg proteína.h). A tilápia foi bastante resistente ao aumento de salinidade, apenas com redução da atividade da AC branquial, compatível com a supressão da absorção de íons em água salgada. Esta capacidade regulatória da espécie aumenta o risco de sua dispersão para bacias adjacentes e isto pode ser potencializado com seu cultivo em tanques rede próximo a estuários. Reconhecendo os prejuízos que a dispersão da espécie pode causar em ambientes naturais, é interessante discutir novas formas de manejo e/ou cultivo da espécie.

Palavras-chaves: introdução de espécies, tilápia do Nilo, plasticidade osmorregulatória, atividade enzimática

ABSTRACT

Nile tilapia is one of the most important species of fishculture in world as in Brazil. The specie belong to cichlids family, recent re-invaders of freshwater and thus eurihalines. The culture of tilapia in cage-nets increases your dispersion to environment. When is cultivated near estuaries, add your eurihalinity, it can disperse to other neighboring basins. There is knowledges about Nile tilapia eurihalinity, but abrupt exposure protocols are useful to test the tolerance of the specie, submitted to salinity increase. The quickly answer to salt of the water depends of the activities of osmoregulatory enzyme, like carbonic anhydrase and Na^+, K^+ -ATPase (NAK) in gills and kidney. Contributing to increase the knowledge about the mainly mechanisms for the eurihalinity in freshwater teleosts, cichlids in particular, we tested the extracellular osmotic and ionic homeostases maintenance and the tissue water content and gills and kidney AC and NAK activities from abrupt salinity increase. The tilapias (9-13cm) were acquired from fishculture (Araucária) and carried to laboratory (Curitiba). After acclimatation (5 days) the fishes were put in 12 liters aquaria (20°C), (n=3). The experiments were made in triplicate. The animals (n=9) were submitted to 6, 12 or 24 hours at 0 (freswater, FW), 10, 20, 30, 35 and 40‰ salinities. After this time of exposure the fishes were anesthetized and the blood was taken for plasma assays (osmolality, sodium, potassium, chloride and magnesium). Slices of muscle were taken to determine water content (wet weigth %). In gills and kidney tissues were did analyzes of enzyme activities: AC by pH decrease with time, and NAK by ADP generation sensible to ouabain (5 mM). Statistic: one way ANOVA and Student t-test (salinity and time). The maximal tolerance of tilapia at 30‰ was 9 hours, at 35‰ was 7 hours and at 40‰ was 5 hours. The plasma osmolality in freshwater (252±12 mOsm/kg de H₂O) increased to >350 mOsm/kg de H₂O in salinities over 20‰. Accompanying that, the muscle water content decreased of 79±0,6% in freshwater to <76% in salinities over 20‰. Sodium levels kept regulated. Chloride levels (FW: 118±7 mM) were higher in 6 hours at 35‰ (264±24 mM) and 12 hours at 30‰ (216±18 mM). Potassium levels (FW: 4±0,5 mM) increased after 6 hours of exposure to salnities above 20‰, like magnesium (FW: 0,9±0,08 mM). Gills AC decreased your activity in FW (6 hours): 20±3mg de ptn to 7±2mg de ptn at 30‰. Kidney NAK activity (~9±2 nmol ADP/μg proteína.h) was higher than gill activity (~2±1nmol ADP/μg proteína.h). Nile tilapia was very resistant to salinity increase, with only decrease in gill AC activity compatible with capture ions decrease in seawater. Your regulatory capability increases your possible dispersion to neighboring basins, and this can be bigger with your cage-nets culture near estuaries. Recognizing the damages of the species in natural environment should Foster more caution in the widespread culture of the specie.

Key-words: species introduction, Nile tilapia, osmoregulatory plasticity, enzyme activities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- TABELA 01 - Lista das 10 espécies de animais aquáticos mais introduzidos no mundo, e suas porcentagens de estabelecimento nos locais onde foram introduzidas, e efeitos ecológicos. Em destaque a tilápia do Nilo. Modificado de GARCÍA-BETHOU *et al.* (2005) 06
- FIGURA 01 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Fonte: Modificado de HEIN & BRIANESE (2004)..... 04
- FIGURA 02 - Modelo para a participação de transportadores na a captação de NaCl em células de cloreto (MR) de peixes dulcícolas. A reação enzimática da AC (em azul), no interior da célula, tem como produtos os íons H^+ e o bicarbonato (HCO_3^-). Ambos servem como substrato para os trocadores apicais HCO_3^-/Cl^- (em amarelo) e Na^+/H^+ (em marrom), nas células de cloreto e pavimentosas (P), funcionarem e captarem os íons Cl^- e Na^+ , respectivamente. O hidrogênio gera, pelo funcionamento da H^+ ATPase (em vermelho) apical, um gradiente favorável a entrada de Na^+ , através de canais iônicos (em verde). A bomba NAK (em roxo) basolateral transporta o Na^+ captado para o sangue do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que sai em seguida por canais basolaterais, contribuindo para a negatividade do lado intracelular. Modificado de MARSHALL (2002) 11
- FIGURA 03 - Modelo para a participação de transportadores encontrados nas células de cloreto (MR) para a secreção de NaCl em peixes marinhos. A bomba NAK basolateral (em roxo) gera o gradiente necessário para internalização de sódio por trocadores. Em

seguida, a secreção de Cl^- é feita por canais iônicos e o Na^+ (em verde) é transportado por via paracelular por causa da positividade serosa (porção basal da célula) criada pela recirculação de K^+ basolateral. (AC - célula acessória; P - célula pavimentosa). Modificado de MARSHALL (2002) 12

FIGURA 04 - Modelo proposto para colocação da enzima AC e da bombas NAK em células branquiais pavimentosas de *O. mossambicus*, evidenciando o papel comum para captação de NaCl. A bomba H^+ -ATPase, encontrada preferencialmente em peixes dulcícolas gera gradientes favoráveis a captação de Na^+ . Ainda não há evidência desta colocação em células de cloreto. Modificado de CHANG & HWANG (2004) 12

FIGURA 05 - Modelo para a participação de transportadores na acidificação da urina e reabsorção tubular de NaCl em células do túbulo proximal (TP) renal (teleostes marinhos). A reação enzimática da AC (em azul), no interior da célula, tem como produtos os íons H^+ e o bicarbonato (HCO_3^-). Ambos servem como substrato para os trocadores apicais $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ e Na^+/H^+ . A bomba H^+ -ATPase apical (em vermelho) promove a extrusão de prótons, que é acompanhada, em consequência, pelo efluxo de água. A bomba NAK (em roxo) basolateral transporta o Na^+ para o sangue do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que sai em seguida por canais basolaterais, contribuindo para a negatividade do lado intracelular. Modificado de MARSHALL & GROSELL (2006) 14

FIGURA 06 - Mortalidade observada nos testes preliminares a transferências abruptas para salinidades mais elevadas (30, 35 e 40‰) em *O. niloticus*, após 6, 12 ou 24 horas de exposição 23

FIGURA 07 - Osmolalidade em (A) 6, (B) 12 ou (C) 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. No eixo “x” está representada a osmolalidade medida nas águas. Teor hídrico em (D) 6, (E) 12 ou (F) 24 horas de exposição às diferentes salinidades. Letras diferentes identificam aumentos da osmolalidade e diminuição do teor hídrico muscular. Ausência de letras em um mesmo gráfico identifica igualdade estatística entre os grupos. (*) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 12 horas. (#) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 24 horas. Não houve diferença na osmolalidade e teor hídrico muscular entre os tempos de exposição de 12 x 24 horas. (4<n = 9) 25

FIGURA 08 - Concentração de Na⁺ (mM) plasmático após (A) 6, (B) 12 ou (C) 24 horas de exposição, e de Cl⁻ (mM) plasmático após (D) 6, (E) 12 ou (F) 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. Letras diferentes identificam diferenças na concentração iônica. Ausência de letras em um mesmo gráfico identifica igualdade estatística entre os grupos. A concentração dos íons sódio e cloreto (mM) nas águas é calculada segundo tabela de composição de água do mar padrão, de PROSSER (1973). (*) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 12 horas. Não houve diferença nas concentrações iônicas entre os tempos de exposição de 6 x 24 horas e 12 x 24 horas (4<n = 9) 27

FIGURA 09 - Concentração de K^+ (mM) plasmático após (A) 6, (B) 12 ou (C) 24 horas de exposição. Concentração de Mg^{+} (mM) plasmático após (D) 6, (E) 12 ou (F) 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. Letras diferentes identificam diferenças na concentração iônica. Ausência de letras em um mesmo gráfico identifica igualdade estatística entre os grupos. A concentração dos íons potássio e magn[esio] (mM) nas águas é calculada segundo tabela de composição de água do mar padrão, de PROSSER (1973). (*) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 12 horas. Não houve diferença nas concentrações iônicas entre os tempos de exposição de 6 x 24 horas e 12 x 24 horas (4<n = 9) 29

FIGURA 10 - Atividade específica da anidrase carbônica (A) branquial e (B) renal; da bomba NAK (C) branquial e (D) renal após 6, 12 ou 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. Letras diferentes identificam aumentos na atividade enzimática. Devido a taxa de mortalidade (50%) dos espécimes, não foi feita análise estatística para 35 e 40‰. (*) Indica diferença entre as atividades de brânquias e rins nos diferentes tempos de exposição e salinidades. (1<n =9) 31

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AQUICULTURA – PISCICULTURA E A INTRODUÇÃO DE ESPÉCIES	1
1.2 TILÁPIA DO NILO	3
1.3 OSMORREGULAÇÃO EM PEIXES ÓSSEOS TELEÓSTEOS	8
1.3.1 Anidrase carbônica	14
1.3.2 Na^+,K^+ -ATPase	15
1.4 EXPOSIÇÕES ABRUPTAS A AUMENTOS DE SALINIDADE: HIPÓTESES DE TRABALHO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	18
3. METODOLOGIA.....	18
3.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO	18
3.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS	19
3.3 DOSAGENS PLASMÁTICAS	20
3.4 TEOR HÍDRICO MUSCULAR	20
3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	20

3.5.1 Anidrase carbônica	20
3.5.2 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	21
3.5.3 Proteínas totais	22
3.6 ESTATISTICA	22
4. RESULTADOS	23
4.1 TESTES PRELIMINARES DE TOLERÂNCIA À TRANSFERÊNCIA ABRUPTA PARA SALINIDADES ELEVADAS	23
4.2 OSMOLALIDADE PLASMÁTICA E TEOR HÍDRICO MUSCULAR	24
4.3 ÍONS PLASMÁTICOS	26
4.3.1 Sódio e cloreto	26
4.3.2 Potássio e magnésio	28
4.4 ENZIMAS	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 AQUICULTURA - PISCICULTURA E A INTRODUÇÃO DE ESPÉCIES

No Brasil, a aquicultura em água continental ostenta 69,7% da produção nacional em aquicultura, o que evidencia seu predomínio em sistemas de cultivo. Neste sistema, 99,4% do cultivo é baseado na produção de peixes. Programas de governo estimulam a criação de peixes de água doce, visto que a piscicultura é uma oportunidade de emprego e renda familiar (CALDAS, 2012). Por outro lado, a piscicultura é a principal atividade dispersora de espécies não nativas em ecossistemas continentais brasileiros (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996; ORSI & AGOSTINHO, 1999; BIZERRIL & PRIMO, 2001; AGOSTINHO *et al.*, 2007). As espécies cultivadas podem adentrar o ambiente natural por escapes (ARTHUR *et al.*, 2010), através do manejo do criador nos tanques, por esvaziamentos ou transbordamentos dos mesmos, ou ainda por rompimento de barragens (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996). O Brasil pode ser considerado o país com maior introdução de espécies extracontinentais, visto que 87% da produção nacional não é baseada em espécies nativas (CASAL, 2006). Entre estas, as principais espécies cultivadas são as tilápias (~38%) e as carpas (~24%) (IBAMA, 2012).

A introdução de espécies pode provocar alterações no ambiente, e afetar o equilíbrio ecológico de um ecossistema (ZAMBRANO, 2006; AGOSTINHO *et al.*, 2007; VITULE, 2009). Este desarranjo ecológico pode ser gerado por hibridização (que provoca a perda do patrimônio genético original), alterações tróficas, parasitoses e outras doenças (TAYLOR *et al.*, 1984), eventos que podem culminar em extinções e perda da biodiversidade (FULLER *et al.*, 1999). Por isso a introdução de espécies é considerada a principal ameaça para a conservação de peixes de água doce (COLLARES-PEREIRA & COWX, 2004). Ainda assim, alguns fatores, como a globalização, fazem com que o número de espécies introduzidas em caráter mundial mantenha-se em contínua expansão (McNEELY, 2001; AGOSTINHO *et al.*, 2007). A introdução de espécies é feita de forma intencional ou não (VITULE, 2009), com falta de estudos rigorosos sobre seu impacto, principalmente nos países em

desenvolvimento (PULLIN & LOWE-McCONNELL, 1982; CASAL, 2006; ARTHUR *et al.*, 2010). A entrada de espécies não nativas se dá principalmente pela propaganda que se faz de que utilizar apenas espécies nativas seria ineficiente para suprir a necessidade de demandas de produção, sendo assim mais rentável usar espécies que possuem suas características de cultivo (por exemplo, rápido crescimento) conhecidas (McNEELY, 2001). O lucro econômico imediato é o fator que mais chama atenção dos produtores de espécies não nativas. Este, contudo, por muitas vezes é apenas teórico e perverso (VITULE, 2009; VITULE *et al.*, 2009). Isso porque a utilização de espécies introduzidas pode resultar em pressão ambientalista, saturação das espécies introduzidas e a longo prazo, prejuízos econômicos (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996), já que como exemplo, o produtor pode precisar aplicar mais recursos para o controle de novas doenças e patógenos possivelmente disseminados pela espécie introduzida (McNEELY, 2001).

Mesmo com estes aspectos ecológicos da introdução de espécies, o Código Florestal Brasileiro, com suas novas propostas, tem sugerido explicitamente o favorecimento da introdução de peixes não nativos (MAGALHÃES *et al.*, 2011). A Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento aprovou o Projeto de Lei 5989/09 do deputado Nelson Meurer (PP-PR) que “naturaliza” espécies não-nativas, como *Oreochromis niloticus*, (tilápia do Nilo) para a criação em tanques-rede (FIGURA 01) (LIMA JR *et al.*, 2012). A grande quantidade de reservatórios públicos (FIGUEIREDO JR & VALENTE JR, 2008) e a disponibilidade de águas represadas, que preenche em área o que o mercado exige (MALLASEN *et al.*, 2008), são um dos atrativos para a utilização deste sistema de cultivo no Brasil. A viabilidade econômica e baixas oscilações de preços e juros do mercado são outros fatores que fazem este sistema de criação potencialmente se tornar o mais importante (DA SILVA, 2012). A Agência Nacional das Águas apoia o desenvolvimento da piscicultura baseada no sistema de tanques-rede, devido à sua rentabilidade (ANA, 2005). O baixo investimento inicial deste sistema, se comparados aos sistemas de tanques escavados, é a principal via para a lucratividade do piscicultor (FURLANETTO *et al.*, 2006).

Para os que defendem a utilização deste sistema de criação, além da vantagem econômica, o sistema de tanques-rede apresenta pequena variação de parâmetros abióticos durante a criação, facilidade para retirada dos peixes, bem como menor manuseio dos peixes (FURLANETTO *et al.*, 2006). Em oposição à

FURLANETTO *et al.* (2006), ZIMMERMANN & FITZSIMMONS (2004) *apud* AYROZA (2009) observam que no cultivo de tanques-rede há uma grande intervenção por parte do criador. Neste sistema, a despesca ocorre na margem ou no corpo da água do ambiente natural, utilizando puçá ou levantando o tanque-rede, respectivamente. Ainda, mesmo com o monitoramento adequado das estruturas de sustentação e das malhas, é comum encontrar peixes de outras espécies nos tanques de cultivo (GOVERNO DE MINAS, 2007), sugerindo que os peixes cultivados também podem escapar para o ambiente natural. No sistema de tanques-rede, também se observa a degradação do sistema natural nas áreas de imediações do cultivo. O tratamento contra parasitas se faz a partir do lançamento do produto diretamente na água. A quantidade de ração administrada e os produtos metabólitos das espécies cultivadas aumentam a carga de matéria orgânica e particulada para o ambiente natural (FERREIRA *et al.*, 2005).

Mesmo com o risco de mudança da qualidade da água e de dispersão das espécies cultivadas, o aumento da demanda na produção de peixes faz com que o sistema de tanques-rede seja cada vez mais recomendado e utilizado (SABBAG *et al.*, 2007; ZIMMERMANN & FITZSIMMONS, 2004 *apud* AYROZA, 2009). Muitos programas de governo apoiam e/ou aprovam este sistema de cultivo, elaborando manuais que integram dicas e regras para a criação com reforço a ideia de rentabilidade da atividade comercial, a exemplo da CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales de São Francisco e da Parnaíba), EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas) e SOBER (Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural).

1.2 TILÁPIA DO NILO

A tilápia da espécie *Tilapia rendalli* foi introduzida a partir de 1952 para aumentar estoques em tanques de criação (FROESE & PAULY, 2007), em açudes do Nordeste. Devido ao baixo crescimento, esta espécie foi gradativamente substituída pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Nesta região, em 1971, foi implantado oficialmente um programa para repovoamento de reservatórios utilizando

alevinos da tilápia do Nilo, através do DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (FIGUEIREDO JR & VALENTE JR, 2008). A tilápia do Nilo (FIGURA 01) *O. niloticus* (Perciformes: Cichlidae) Linnaeus (1758) é nativa das drenagens africanas, principalmente do rio Nilo e regiões costeiras de Israel (FULLER *et al.*, 1999; FROESE & PAULY, 2007). Quando jovem é zooplantívora, e onívora quando adulta, alimentando-se principalmente de fitoplâncton e algas bentônicas (CARDOSO, 2009). Pode alcançar até 4,5 kg de peso total e 60 cm de comprimento (FAO, 2006).



FIGURA 01 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Fonte: Modificado de HEIN & BRIANESE (2004).

A tilápia do Nilo é uma espécie dulcícola eurihalina (VILLEGAS, 1990; NUGON JR, 2003) - ou seja, com grande tolerância a aumentos de salinidade da água (JOBLING, 1995; EVANS *et al.*, 2005; PRODOCIMO *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2008). Assim, embora dulcícola, pode ser naturalmente encontrada em ambientes com amplas variações de salinidade (regiões de estuários) (SCHOFIELD *et al.*, 2010). A ordem à qual pertence, Perciformes, tem origem marinha. A família Cichlidae tem ocupação secundária de águas continentais, água doce. Por isso seus representantes são, com frequência, extremamente eurihalinos, considerados invasores recentes de água doce (CHAKRABARTY, 2004; NELSON, 2006; FREIRE *et al.* 2008). Esta história evolutiva certamente tem influência sobre a tolerância das tilápias à salinidade (VILLEGAS, 1990; NUGON JR, 2003). Alguns estudos observam que em transferências graduais, 50% dos espécimes de *O. niloticus*

toleram águas hipersalinas, de 46‰ (LEMARIÉ *et al.*, 2004). Enquanto isso, em transferências diretas, o tempo médio de sobrevivência na água do mar é de 4 horas (GÜNER *et al.*, 2005). Ainda assim, dentre distintas espécies de tilápias (*O. mossambicus*, *O. spirulus* e *O. aureus*), a tilápia do Nilo é a menos eurihalina (AL-AMOUDI, 1987), apresentando um desequilíbrio de seu balanço hidromineral em salinidades superiores a 18‰ (WATANABE *et al.*, 1985; AL-AMOUDI, 1987; VILLEGAS, 1990), com aumento de 27% das concentrações de Na⁺ e K⁺ em relação as concentrações dos íons em água doce (KARSI & YAVUZCAN YLDIZ, 2005).

Além da eurihalinidade, a tilápia do Nilo tolera ampla variação de outros parâmetros abióticos, como temperatura, amônia e oxigênio dissolvido (KOLAR & LODGE, 2002). Também apresenta elevada taxa reprodutiva. Estas características, combinadas com seu hábito alimentar generalista (ATTAYDE *et al.*, 2007) junto ao comportamento agressivo e territorialista, que em conjunto pode alterar drasticamente a biota nativa do local (BARRETO *et al.*, 2011), favorece sua competição por recursos do ambiente, explicando em parte seu potencial invasor e seu amplo uso em cultivo no mundo inteiro (KOLAR & LODGE, 2002). A espécie apresenta outras características que chamam a atenção do produtor, como excelentes taxas de crescimento, baixa susceptibilidade a doenças (PULLIN & LOWE-McCONNELL, 1982; SANTOS *et al.*, 2007), ciclo de engorda curto (~6 meses), desova anual, adaptação em diferentes sistemas de cultivo, além de qualidades organolépticas, como cor, sabor, textura e baixa caloria, que chamam a atenção de consumidores (MEURER *et al.*, 2002; FIGUEIREDO JR & VALENTE JR, 2008). A maior restrição a seu cultivo é a reprodução precoce, a partir dos quatro meses de idade, que pode causar superpovoamento nos tanques. Porém este empecilho pode ser resolvido pela utilização de alevinos machos revertidos (SEBRAE, 2008).

A tilápia do Nilo ocupa o sexto lugar (TABELA 01) das 10 espécies de animais aquáticos mais introduzidos do mundo (GARCÍA-BERTHOUS *et al.*, 2005). Porém a espécie pode ocupar o quarto lugar se observadas as porcentagens de estabelecimento no ambiente natural, bem como seus efeitos ecológicos no mesmo. É considerada mundialmente uma das mais importantes para a piscicultura (FULLER *et al.*, 1999; FROESE & PAULY, 2007), tendo sua posição de espécies cultivadas precedida apenas por *Cyprinus carpio*, a carpa comum (ZIMMERMANN & FITZSIMMONS, 2004 apud AYROZA, 2009). Tornou-se a principal espécie de peixe

cultivada no Brasil (FAO, 2006). Entre 1996 a 2005, a produção da tilápia do Nilo cresceu 23% ao ano, sendo a exportação para países americanos o principal motivo para este crescimento. Em 2005, o cultivo das tilápias se intensificou principalmente na região Nordeste e Sul, que representaram 37,8% e 31,8% da produção nacional de tilápias, respectivamente (SEBRAE, 2008), e duplicaram a produção de cerca de 35 mil toneladas do ano de 2001 (SABBAG *et al.*, 2007). A importância da espécie para a piscicultura fez com que se criasse um termo que designa sua criação: a “tilapicultura” (FIGUEIREDO JR & VALENTE JR, 2008).

TABELA 01 - Lista das 10 espécies de animais aquáticos mais introduzidos no mundo, e suas porcentagens de estabelecimento nos locais onde foram introduzidas, e efeitos ecológicos. Em destaque a tilápia do Nilo. Modificado de GARCÍA-BETHOU *et al.* (2005).

	Número de Introduções	% de estabelecimento no ambiente natural	% de efeitos ecológicos causados
<i>Oreochromis mossambicus</i>	172	85,9	81
<i>Cyprinus carpio</i>	124	82,0	86
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	99	53,8	88
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	91	11,3	60
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	79	26,8	75
<i>Oreochromis niloticus</i>	78	70,2	75
<i>Gambusia spp.</i>	67	96,8	50
<i>Micropterus salmoides</i>	64	72,9	86
<i>Arischthys nobilis</i>	55	19,6	80
<i>Carassius auratus</i>	54	92,3	75
<i>Lepomis gibbosus</i>	25	91,3	71
<i>Procambrus clarkii</i>	24	88,9	86

A tilápia do Nilo se sobressai entre as espécies de peixes na bacia do Paraná (AGOSTINHO & JÚLIO JR., 1996). Também é destacada em inúmeros trabalhos que mencionam os efeitos da introdução de espécies nos ambientes naturais, incluindo efeitos ecológicos de sua introdução no Brasil, gerando desequilíbrios ecológicos e impactos ambientais (e.g. OGUTU-OHWAYO, 1990; FULLER *et al.*, 1999; BIZERRIL & PRIMO, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2005; AGOSTINHO *et al.*, 2007; VITULE, 2008). A introdução desta espécie pode resultar em diminuição ou extinção de

espécies nativas por sobreposições tróficas e competição por locais de desova, destruição de habitat, mudança de qualidade de água e hibridização com outras espécies do mesmo gênero (WEYL, 2008). Seu hábito alimentar pode intensificar a eutrofização de reservatórios, a partir da cascata trófica e aumento do aporte interno de nutrientes (CARDOSO, 2009). Em um açude de Gargalheiras (RN), a tilápia do Nilo diminuiu a biomassa de zooplâncton e aumentou a turbidez da água pelo seu hábito de revolver o fundo lodoso (ATTAYDE *et al.*, 2007). Modelos matemáticos aplicados à predição de invasão por espécies introduzidas, utilizando métodos como a georeferência, antecipam que *O. niloticus*, por ter uma distribuição concentrada nos trópicos e áreas costeiras, pode seriamente afetar a fauna de espécies nativas em regiões como a bacia Amazônica (ZAMBRANO, 2006).

No Estado do Paraná a produção de tilápias preencheu 80% da produção de peixes de 2004 (HEIN & BRIANESE, 2004). O Estado do Paraná foi pioneiro na organização do cultivo de tilápias, tornando-se o maior produtor da espécie até o ano de 2003, com 17,3% da produção nacional, perdendo apenas para o Ceará (26,1%) (FIGUEIREDO JR & VALENTE JR, 2008). Embora ainda ocupe o segundo lugar, a criação de tilápias responde por 70% da produção paranaense de peixes (IGARASHI, 2011). O Paraná foi o primeiro Estado a produzir alevinos de tilápia do Nilo, sendo até hoje o principal fornecedor (SUSSEL, 2010). A empresa paranaense “Aquabel” produz 2.000.000 alevinos por mês, e pode duplicar sua produção (IGARASHI, 2011). Além disso, o Estado foi pioneiro na importação de material genético de linhagens Gift, Tailandesa e Supreme, para aumentar as taxas de crescimento nos cultivos (SUSSEL, 2010).

Muitos programas de governo beneficiam a produção intensiva em tanques-rede da tilápia do Nilo. Um projeto do Sebrae, no Espírito Santo, gerou a montagem de 156 tanques-rede, com mais de 70 mil tilápias (SEBRAE, 2012). Em Minas Gerais, a Emater vai distribuir, até o fim do semestre deste ano, 37 conjuntos de tanques-rede, estimando uma produção de 210 toneladas de tilápia (EMATER, 2012). A implantação do Complexo Industrial de Piscicultura no Estado do Acre estipula o aumento de 400% na produção de tilápias, pela construção de 700 tanques em vários municípios (TEIXEIRA, 2011). Na região oeste do Estado do Paraná, uma área de 24000 km² (oito tanques, aproximadamente) produziu em 2004 cerca de 15 toneladas de tilápias (ANDRADE *et al.*, 2005). A Estância Alvorada,

também no Paraná, é instalada na represa Capivara e mantém 750 tanques-rede com produção média de 850 toneladas de tilápias por ano (IGARASHI, 2011).

A produção em pisciculturas, aliada à eurihalinidade das tilápias, faz com que cresça a tendência de cultivá-las dentro de tanques-rede também em águas salobras (KARSI & YAVUZCAN YLDIZ, 2005; RENGMARK *et al.*, 2007). No Brasil, a produção de tilápias em estuários com produção próxima ao cultivo em água doce vem avançando desde pesquisas iniciais de 2001 (KUBITZA, 2005). No município de Cairu (BA) o projeto Cadeia Produtiva da Aquicultura, executado pelo Programa de Desenvolvimento Integrado e Sustentável do Baixo Sul (DIS Baixo Sul) em parceria com o Instituto para o Desenvolvimento Sustentável do Baixo Sul (Ides) e Sebrae, dez tanques-rede são montados em águas estuarinas, com a produção de 4,4 mil tilápias (PERFEITO, 2007). Cultivos de tilápias em águas estuarinas podem potencializar sua dispersão para outras regiões geográficas, a partir do estabelecimento em outras bacias hidrográficas, usando regiões estuarinas como “pontes” (GÜNER *et al.*, 2005; RAHEL, 2007; VITULE 2008; MATEO *et al.*, 2011). Estuários são regiões de água salobra (0,6 - 29‰) (CONAMA, 2005), que funcionam como um filtro biológico para a dispersão de organismos (PIECHNICK, 2006). São sistemas dinâmicos que possuem amplas variações de seus parâmetros ambientais em um curto espaço de tempo sendo dependentes de padrões sazonais e climáticos (MARONE *et al.*, 2005). Diferenciam-se de águas oceânicas ou costeiras, pois as trocas ou misturas dos corpos d’água são potencializadas por ações da maré, do fluxo fluvial, do vento, da radiação e das ondas (MARONE *et al.*, *no prelo*).

1.3 OSMORREGULAÇÃO EM PEIXES ÓSSEOS TELEÓSTEOS

Os peixes teleósteos (peixes ósseos com cauda homocerca, escamas cicloides e bexiga natatória) (NELSON, 2006) mantêm sua concentração osmótica em torno de 1/4 a 1/3 da concentração da água do mar (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; EVANS *et al.*, 1999, 2005; PRODOCIMO & FREIRE, 2001), sendo as dulcícolas hiperosmóticas em relação ao meio, apresentando osmolalidade plasmática de 230-330 mOsm/kg H₂O (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; EVANS *et al.*, 1999, 2005; PRODOCIMO & FREIRE, 2001; FREIRE *et al.*, 2008). Nos

teleósteos dulcícolas, dependendo do seu grau de tolerância à salinidade, transferências para águas mais salinas em geral provocam aumentos na osmolalidade plasmática, e em consequência, perda de água celular/tecidual, se a capacidade de regular volume celular for ultrapassada. Estes efeitos indicam estresse osmótico (FREIRE *et al.*, 2008). A osmorregulação é responsável pela manutenção da homeostasia osmótica e iônica do meio extracelular. Animais aquáticos que investem energia para manter este gradiente, com atuação principalmente do epitélio branquial, são conhecidos como osmorreguladores e executam a Regulação Anisomótica Extracelular (RAE), termo proposto por Florkin, 1962 (EVANS *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008). Esta capacidade regulatória pode se relacionar com o tempo de evolução da espécie em determinado habitat e migrações de seus ancestrais entre os ambientes de água doce e do mar (FREIRE *et al.*, 2008). Espécies de água doce que tolerem entradas e permanência em estuários são consideradas eurihalinas. Para uma espécie de água doce conseguir tolerar aumentos de salinidade no seu ambiente, é requisito fundamental ter a capacidade de interromper a absorção de sal que realiza em água doce, e/ou possivelmente secretar sais através de seus epitélios de transporte de sal, além de assegurar a manutenção da hidratação dos tecidos corporais (WOOD & PÄRT 1997, SAKAMOTO *et al.*, 2001; FREIRE *et al.*, 2008).

As brânquias de teleósteos são órgãos que desempenham um papel chave na manutenção da homeostasia do meio interno (EVANS *et al.*, 2005), através da captação de íons em teleósteos de água doce (FIGURA 04) e secreção de íons do fluido corpóreo em teleósteos de águas salgadas (FIGURA 05) (FOSKETT & SCHEFFEY, 1982; HIROI *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2005). Apresentando uma grande superfície de contato com o meio externo, as brânquias se tornam sensíveis a alterações ambientais físicas ou químicas (FLORES-LOPES & THOMAZ, 2011). O epitélio respiratório branquial é composto por células pavimentosas (>90%) (EVANS *et al.*, 2005) e células de cloreto (<10%) (EVANS *et al.*, 2005). As células de cloreto apresentam numerosas mitocôndrias e extenso sistema tubular (HIROI *et al.*, 1999; GÜNER *et al.*, 2005) e se localizam principalmente em regiões interlamelares (GÜNER *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2005), esparsas ao longo do filamento e nas bases das lamelas (GÜNER *et al.*, 2005). Em peixes dulcícolas, são os principais sítios para o transporte transepitelial de íons (HWANG, 2009), sobretudo de Ca^{2+} e Cl^- (PERRY, 1997).

Diante de exposições à água do mar, observa-se aumento da área e número de células de cloreto em *T. melanotheron* (OUATTARA *et al.*, 2009), enquanto em *O. mossambicus* reduz-se o número, mas aumenta o tamanho das células de cloreto (VAN DER HEIDJEN, 1997). Em algumas espécies de peixes dulcícolas estudadas como *Poecilia reticulata* (PISAM *et al.*, 1987), *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* (HWANG *et al.*, 2011) e *O. mossambicus* (HWANG, 2009) foram identificados diferentes subtipos de células de cloreto, com densidades e tamanhos relacionados com os transportadores expressos em sua membrana plasmática e com a captação e/ou secreção de íons - Na^+ , Cl^- , H^+ e Ca^{2+} (PISAM *et al.*, 1987; TANG *et al.*, 2008; HWANG, 2009; WANG *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2011). Aparentemente, a habilidade de *O. mossambicus* em tolerar amplas variações de salinidade relaciona-se com a resposta destes subtipos celulares (UCHIDA *et al.*, 2000).

A resposta mais frequente diante de transferência para água do mar, após alguns dias ou semanas de aclimação, é o aumento do número de células de cloreto (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; McCORMICK, 1995; UCHIDA *et al.*, 1996; ZADUNAISKY, 1996; MARSHALL *et al.*, 2002a,b; 2005; MARSHALL, 2003; GÜNER *et al.*, 2005; SHIVKAMAT & ROY, 2005; HORNG *et al.*, 2009). Esta proliferação celular é controlada pelos hormônios cortisol, do crescimento (AYSON *et al.*, 1993; EVANS, 1993; JOBLING, 1995; McCORMICK, 1995; UCHIDA *et al.*, 1996; ZADUNAISKY, 1996; MARSHALL *et al.*, 2002a,b; 2005; MARSHALL, 2003) e prolactina, que também controlam a mudança morfológica de seus subtipos celulares (AYSON *et al.*, 1993; PISAM *et al.*, 1993).

As células de cloreto possuem também um papel integral na regulação ácido-base. Nas brânquias de teleósteos de água doce, a anidrase carbônica (AC), junto com as bombas Na^+, K^+ -ATPase (NAK) e H^+ -ATPase - encontrada preferencialmente em peixes dulcícolas (EVANS *et al.*, 2005) - atuam neste balanço ácido-base, além de atuar na regulação iônica através da captação de sal (EVANS *et al.*, 2005; SHIVKAMAT & ROY, 2005; HORNG *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010). A anidrase carbônica (AC) gera os contra-íons para o funcionamento de trocadores que captam o cloreto (trocado por bicarbonato) de sódio (trocado por prótons) e a bomba NAK faz a absorção de sódio através da membrana basolateral (eg.: EVANS *et al.*, 2005). Devido às mínimas concentrações de sais em água doce, a H^+ -ATPase apical gera um gradiente elétrico que favorece a entrada de sódio por canais de sódio (FENWICK *et al.*, 1999; CHANG & HWANG, 2004; McCORMICK *et al.*, 2009).

Em *O. mossambicus*, a co-localização (FIGURA 06) da AC, da NAK e da H^+ -ATPase é observada apenas nas células pavimentosas (EVANS *et al.*, 2005), faltando evidências para esta co-localização nas células de cloreto (CHANG & HWANG, 2004). Nesta mesma espécie, esta localização conjunta tem como papel principal a captação de cloreto. A expressão das três proteínas chega a ser o dobro em água com níveis de 0,002 a 0,012 mM de cloreto, quando comparadas a águas com níveis altos do íon, de 7,3 mM, por exemplo (CHANG & HWANG, 2004).

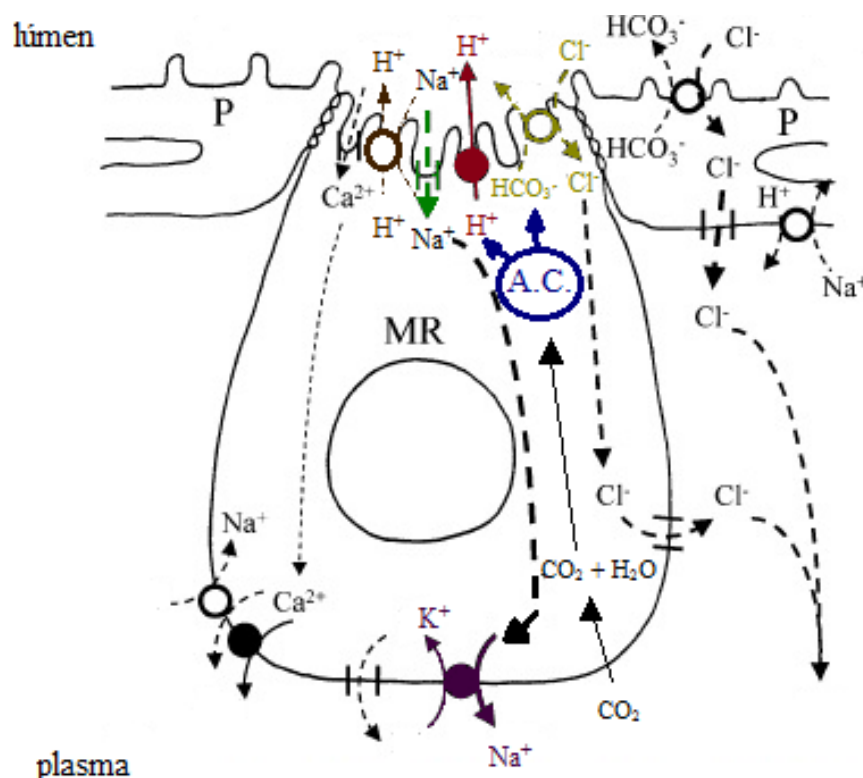


FIGURA 02 - Modelo para a participação de transportadores na captação de NaCl em células de cloreto (MR) de peixes dulcícolas. A reação enzimática da AC (em azul), no interior da célula, tem como produtos os íons H^+ e o bicarbonato (HCO_3^-). Ambos servem como substrato para os trocadores apicais HCO_3^-/Cl^- (em amarelo) e Na^+/H^+ (em marrom), nas células de cloreto e pavimentosas (P), funcionarem e captarem os íons Cl^- e Na^+ , respectivamente. O hidrogênio gera, pelo funcionamento da H^+ ATPase (em vermelho) apical, um gradiente favorável a entrada de Na^+ , através de canais iônicos (em verde). A bomba NAK (em roxo) basolateral transporta o Na^+ captado para o sangue do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que sai em seguida por canais basolaterais, contribuindo para a negatividade do lado intracelular. Modificado de MARSHALL (2002).

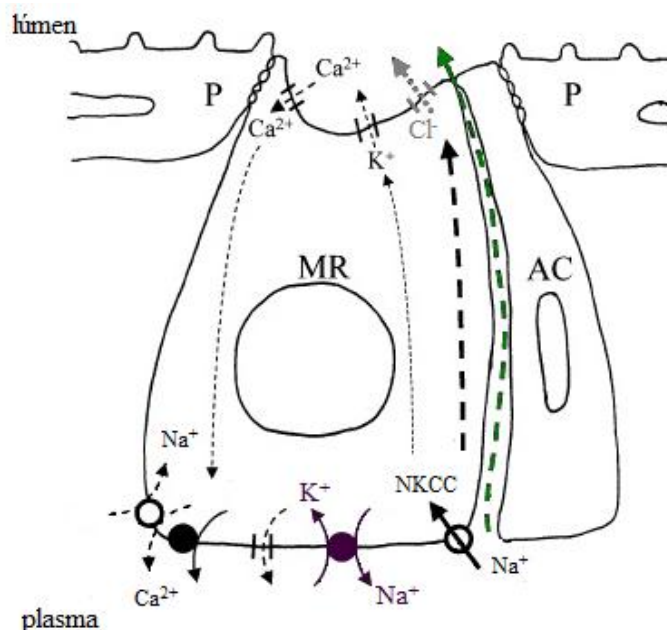


FIGURA 03 - Modelo para a participação de transportadores encontrados nas células de cloreto (MR) para a secreção de NaCl em peixes marinhos. A bomba NAK basolateral (em roxo) gera o gradiente necessário para internalização de sódio por trocadores. Em seguida, a secreção de Cl^- é feita por canais iônicos e o Na^+ (em verde) é transportado por via paracelular por causa da positividade serosa (porção basal da célula) criada pela recirculação de K^+ basolateral. (AC - célula acessória; P - célula pavimentosa). Modificado de MARSHALL (2002).

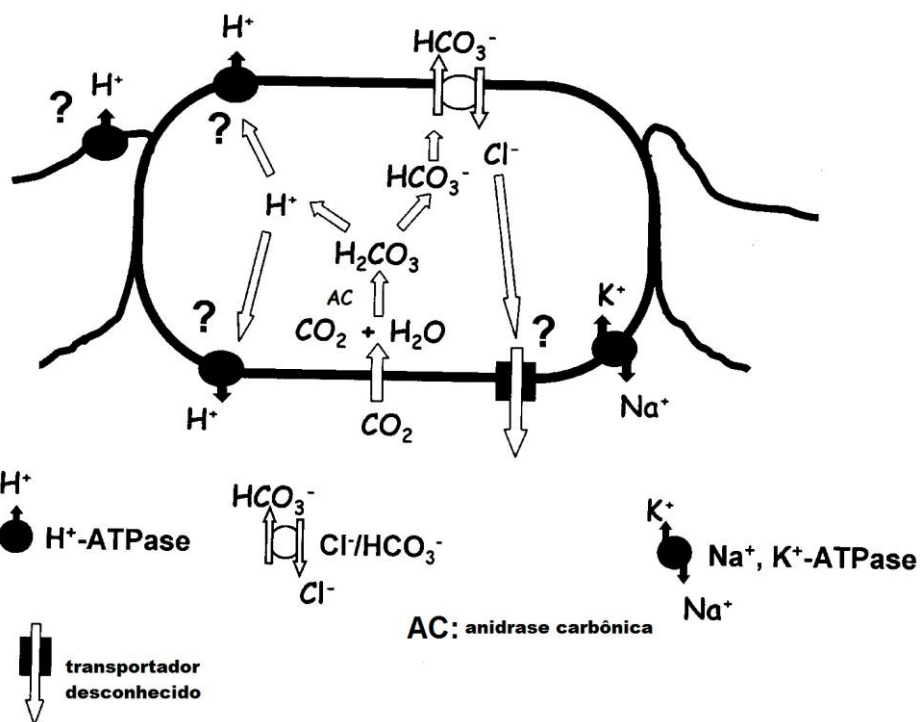


FIGURA 04 - Modelo proposto para colocalização da enzima AC e da bomba NAK em células branquiais pavimentosas de *O. mossambicus*, evidenciando o papel comum para captação de NaCl. A bomba H^+ -ATPase, encontrada preferencialmente em peixes dulcícolas gera gradientes favoráveis a captação de Na^+ . Ainda não há evidência desta colocalização em células de cloreto. Modificado de CHANG & HWANG (2004).

Em alguns estudos com peixes eurihalinos, como *Fundulus heteroclitus*, a diferenciação das células de cloreto acompanha uma redistribuição e inserção de transportadores nas células de cloreto, dependente da salinidade a que o peixe é submetido. Em água doce, 90% dos canais iônicos de cloreto (CFTR) são difusos, expressos dentro de vesículas espalhadas pelo citosol. Após 48 horas de transferência da água doce para água do mar, 76,3% das células de cloreto apresentam sinal imunoflorescente de CFTR apical. Em transferências da água doce para a do mar, há uma redistribuição do NKCC para regiões basais da membrana - padrão observado nas células de cloreto de teleósteos marinhos, para internalização de NaCl e sequente secreção (MARSHALL *et al.*, 2002a).

Em peixes de água doce, para compensar a perda de sais também há reabsorção tubular do sal filtrado nos rins (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; EVANS *et al.*, 2005; HWANG & LEE, 2007). A formação de urina hipotônica, ou seja, mais diluída do que o plasma, a partir de uma rápida filtração glomerular e um alto fluxo urinário e os sais provenientes da alimentação auxiliam na manutenção da osmolalidade do meio interno (MARSHALL & GROSELL, 2006). Em teleósteos marinhos os rins produzem pequeno volume de urina isosmótica ao plasma (EVANS *et al.*, 2005; MARSHALL & GROSELL, 2006). Existem modelos do funcionamento de rins em teleósteos marinhos (FIGURA 07). A anidrase carbônica gera como produtos íons H^+ , que serão secretados pela bomba H^+ -ATPase para o lúmen, gerando a acidificação luminal. O Na^+ , internalizado pelo trocador Na^+/H^+ , é reabsorvido para o plasma pelo funcionamento da Na^+,K^+ -ATPase (NAK) basolateral e do cotransportador apical NKCC ($Na^+/K^+/2Cl^-$) (MARSHALL & GROSELL, 2006). Este modelo, embora não seja de um peixe dulcícola, pode auxiliar no entendimento de reabsorção de sal pelos rins.

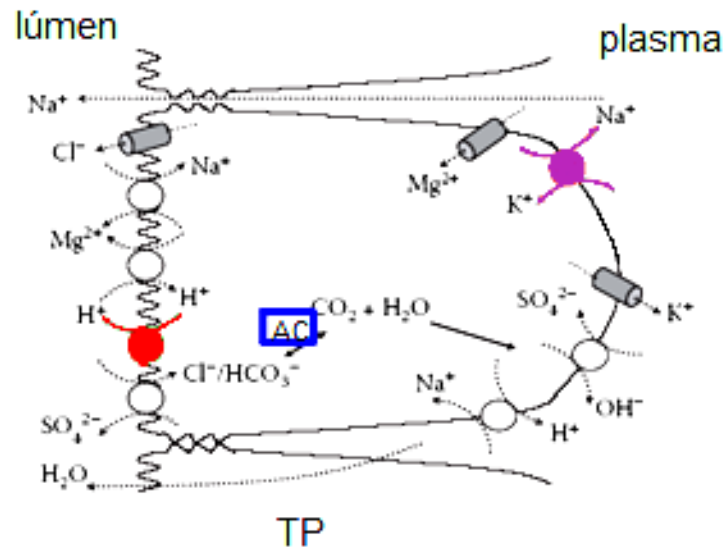


FIGURA 05 - Modelo para a participação de transportadores na acidificação da urina e reabsorção tubular de NaCl em células do túbulo proximal (TP) renal (teleosteos marinhos). A reação enzimática da AC (em azul), no interior da célula, tem como produtos os íons H^+ e o bicarbonato (HCO_3^-). Ambos servem como substrato para os trocadores apicais $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ e Na^+/H^+ . A bomba H^+ -ATPase apical (em vermelho) promove a extrusão de prótons, que é acompanhada, em consequência, pelo efluxo de água. A bomba NAK (em roxo) basolateral transporta o Na^+ para o sangue do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que sai em seguida por canais basolaterais, contribuindo para a negatividade do lado intracelular. Modificado de MARSHALL & GROSELL (2006).

1.3.1 Anidrase carbônica

A metaloenzima anidrase carbônica (AC) é responsável pela catálise da reação reversível de hidratação de CO_2 : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3^* \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (GILMOUR & PERRY, 2009). Nas brânquias, os íons gerados a partir do metabolismo são então trocados na membrana apical do epitélio branquial, respectivamente, por Na^+ e Cl^- , gerando a absorção do sal (revisão em EVANS *et al.*, 2005). Purificadas de brânquias de *Platichthys flesus*, a AC localiza-se principalmente em regiões interlamelares e representa uma enzima solúvel com peso molecular de aproximadamente 30 kD (SENDER *et al.*, 1999). O tratamento com acetazolamida, inibidor da anidrase carbônica, promoveu uma diminuição da captação de cloreto em brânquias de *Carassius auratus* (MAETZ & ROMEU, 1964), resultado similar ao encontrado em *O. mossambicus* (CHANG & HWANG, 2004). Mas existem resultados dúbios para avaliar a relação de sua atividade com

a salinidade (SENDER *et al.*, 1999). Nos rins, sua atividade relaciona-se com a manutenção do equilíbrio ácido-base, auxiliando na ativa reabsorção ou excreção do bicarbonato (HENRY, 1988; PERRY *et al.*, 2003).

1.3.2 Na⁺,K⁺-ATPase

A bomba Na⁺,K⁺-ATPase (NAK) cria gradientes eletroquímicos ao bombear sódio para fora das células e potássio para dentro (LEE *et al.*, 2003), sendo responsável pela manutenção das concentrações de sódio e potássio intracelulares. Os gradientes, especialmente de sódio, energizam vários outros transportadores, como cotransportadores Na⁺/aminoácidos e Na⁺/glicose (HWANG & LEE, 2007; EVANS, 2010). A NAK tem assim papel crucial na entrada de nutrientes (como aminoácidos e glicose) nas células; na regulação de volume celular e na manutenção do potencial de membrana (ENCARNACIÓN LOZANO & ZALDÍVAR-RÍVERON, 2009). Esta proteína transmembrana, em mamíferos, é formada por um complexo protéico ($\alpha\beta$)₂ de aproximadamente 160 kDa, sendo α a subunidade catalítica (WANG *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2011), altamente conservada - desde organismos procarióticos (ENCARNACIÓN LOZANO & ZALDÍVAR-RÍVERON, 2009). A ouabaína é um potente inibidor desta bomba (LEE *et al.*, 2003). Alguns teleósteos apresentam mais isoformas destas subunidades, quando comparados aos mamíferos (HWANG *et al.*, 2011). A expressão de isoformas destas subunidades estão relacionadas a afinidade aos íons transportados, e parecem possuir uma correlação com a quantidade de sal no ambiente, influenciando na adaptação a salinidade de espécies de peixes dulcícolas ou anadrômicas (HWANG *et al.*, 1998; McCORMICK *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2011).

A quantidade de NAK está relacionada com a área das células de cloreto branquiais (ALLEN *et al.*, 2009). Imunoensaios identificaram a localização de NAK na base dos filamentos branquiais de *T. melanotheron*, quando em água doce; e a expansão de imunofluorescências para NAK nas lamelas quando em água do mar ou água hipersalina (OUATTARA *et al.*, 2009). Estas modificações podem ser efeitos da mudança nas células de cloreto, dentro de dias (KAMMERER *et al.*, 2010) e/ou da atividade específica da NAK (BOILY *et al.*, 2007). Em *O. mossambicus*,

Tetraodon nigroviridis e *Acipenser medirostris*, ensaios imunohistoquímicos evidenciam sua localização em túbulos convolutos distais, proximais e coletores dos rins (LIN *et al.*, 2004; ALLEN *et al.*, 2009) e na região interlamelar e dos filamentos branquiais, principalmente em células de cloreto (LEE *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2004; ALLEN *et al.*, 2009). Normalmente, a bomba NAK nas brânquias é suficiente para energizar o transporte de sal, tanto a secreção de sal em água do mar, quando a absorção de sal a partir de água salobra (EVANS *et al.*, 2005; MARSHALL & GROSELL, 2006).

A ativação desta bomba se faz crucial para a aclimação do organismo a mudanças de salinidades (HWANG & LEE, 2007), sendo sua atividade mediada por hormônios (McCORMICK, 1995). Ainda assim, seu papel osmorregulatório não é totalmente elucidado, pois depende da célula ou organismo estudado (ALLEN, *et al.*, 2009; ENCARNACIÓN LOZANO & ZALDÍVAR-RÍVERON, 2009). Observa-se na maioria das vezes o aumento de sua atividade branquial com o aumento de salinidade (HWANG *et al.*, 1998). Por outro lado, em rins de espécies de peixes eurihalinas, a atividade da bomba geralmente é maior em água doce (LIN *et al.*, 2004).

1.4 EXPOSIÇÕES ABRUPTAS A AUMENTOS DE SALINIDADE: HIPÓTESES DE TRABALHO

A maioria dos estudos com tilápia Nilo utiliza o aumento progressivo da salinidade para identificar a faixa de tolerância do peixe (LEMARIÉ *et al.*, 2004; GÜNER *et al.*, 2005; YAO & AHOUSI, 2008; SCHOFIELD *et al.*, 2010; MATEO *et al.*, 2011). Apesar do conhecimento já acumulado na literatura sobre a eurihalidade da tilápia do Nilo, há a necessidade de complementar este conhecimento com a avaliação da sobrevivência e manutenção da homeostasia extracelular diante de exposições abruptas e diretas a aumentos de salinidade. A tolerância a salinidade é um dos fatores que podem ser avaliados para se inferir o potencial de dispersão de uma espécie (SCOTT *et al.*, 2008). Assim, além de estabelecer a tolerância em exposições agudas a diferentes salinidades, este trabalho procura responder a

possibilidade da espécie em dispersar para novas bacias hidrográficas - através de estuários, aliando os resultados obtidos aqui aos já disponíveis na literatura. O cultivo em regiões estuarinas pode potencializar esta dispersão. A sobrevivência, que sinaliza a tolerância do organismo a salinidade, evidencia a capacidade do organismo em regular seus fluidos internos em um curso temporal muito pequeno. Se estes regulam seu meio interno, e ainda competem pelos recursos do ambiente, certamente podem se adaptar a locais com salinidades mais elevadas (e.g. baías). Esta dispersão e adaptação para um novo ambiente influenciam na distribuição geográfica da espécie (WILLMER *et al.* 2005; BEGON *et al.* 2007).

A hipótese de trabalho é a de que a tilápia do Nilo não irá tolerar as salinidades mais próximas a água do mar, e de que suas atividades enzimáticas branquiais e renais irão ser sensíveis ao aumento de salinidade. Em relação a anidrase carbônica transferências para aumentos de salinidade, por não necessitarem captar ativamente o sal (como em água doce) ou reabsorver sal do fluido tubular, provavelmente diminuirão sua atividade específica branquial e renal nas tilápias do Nilo. Se espera que a atividade da bomba NAK nas brânquias aumente com a salinidade ou se mantenha aproximadamente constante. Isto pois enquanto em água doce sua função na regulação do Na^+ está no transporte do íon para o plasma, em aumentos de salinidade a atividade desta enzima continua a ser fundamental para regular as quantidades de Na^+ e K^+ dos meios extra e intracelulares. Nos rins, espera-se que sua atividade diminua em relação à atividade em água doce, já que o Na^+ filtrado não precisa ser reabsorvido para produzir urina diluída.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Diagnosticar o grau de tolerância e a manutenção da homeostasia extracelular da tilápia do Nilo diante de transferências diretas de água doce para salinidades elevadas, ampliar o conhecimento sobre a forma como atividades

enzimáticas (branquiais e renais) são reguladas em espécies de água doce eurihalinas submetidas abruptamente a aumento de salinidade, e inferir o potencial de dispersão da espécie para outras bacias hidrográficas pela possibilidade de utilizar estuários como pontes.

2.2 ESPECÍFICOS

- Submeter tilápias do Nilo a aumentos abruptos de salinidade (10, 20, 30, 35 e 40‰) a partir da água doce, e avaliar:
 - a concentração plasmática osmótica e de íons (Na^+ , K^+ , Mg^+ e Cl^-);
 - o teor de hidratação muscular;
 - as atividades específicas das enzimas anidrase carbônica e Na^+, K^+ -ATPase nos tecidos branquiais e renais; e da H^+ -ATPase no tecido branquial.

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO

As tilápias (9-13 cm) foram adquiridas da piscicultura “Águas Verdes”, em Araucária (PR). De acordo com o piscicultor, todas são revertidas e híbridas de *O. niloticus* com a linhagem GIFT (Genetic Improved Farmed Tilapia), desenvolvida por melhoramento genético (AQUAPORTO, 2009). Os animais coletados foram imediatamente colocados em sacos plásticos do próprio estabelecimento borbulhados com oxigênio que permite por aproximadamente seis horas o transporte dos animais sem submetê-los a uma situação de hipóxia. O transporte, de carro, durou aproximadamente uma hora e meia para cada coleta, até o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, Universidade Federal do Paraná em Curitiba, Paraná, onde foram mantidos por pelo menos cinco dias, em aquário

estoque com capacidade de 250 litros abastecido com água doce filtrada, filtração e aeração constante, temperatura entre 20-22°C e fotoperíodo natural.

3.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Testes preliminares foram conduzidos para identificar os limites de tolerância da espécie em transferências abruptas para águas mais salinas. Nestes testes as tilápias foram submetidas por 6, 12 ou 24 horas às salinidades de 0 (água doce), 10, 20, 30, 35 e 40‰ em aquários de 12 litros contendo 3 peixes. As salinidades foram medidas através de salinômetro. A mortalidade (>90%) em 30 e 35‰ em 24 horas, limitou o aumento do n até 12 horas, enquanto em 40‰ este n foi alcançado apenas para o tempo de 6 horas, já que nos demais tempos a taxa de mortalidade foi de 100%. Nas demais condições e tempos experimentais (0, 10 e 20‰), os experimentos foram repetidos de forma similar, até atingir um n total de 9 animais. Alguns experimentos foram realizados em períodos *overnight* e, portanto, suas respectivas amostras podem ter sido retiradas após certo tempo de morte dos animais. Adicionalmente, alguns espécimes foram retirados antes de encerrado o tempo planejado de exposição, quando os peixes já não respondiam mais a estímulos ou havia perda total de controle motor, embora ainda possuísem fracos batimentos operculares.

Decorridos os tempos experimentais, os peixes foram anestesiados com benzocaína dissolvida em etanol na água do aquário, com concentração final de 120 mg/l. Após anestesia foram coletadas amostra de sangue por punção da veia caudal, ou punção cardíaca após secção medular. As amostras de sangue foram centrifugadas por 3 minutos (5.000xg) e o plasma obtido foi congelado a -80°C até a realização dos ensaios para a determinação da osmolalidade e dos íons sódio, potássio, cloreto e magnésio. Uma amostra de músculo foi retirada e mantida congelada em -80°C até o procedimento para determinação do conteúdo total de água no tecido. Foram dissecadas as brânquias e os rins (dos peixes com 100% de taxa de sobrevivência), congeladas a -80°C até serem feitas as análises das atividades enzimáticas (AC, NAK e H⁺-ATPase) nestes tecidos.

3.3 DOSAGENS PLASMÁTICAS

A osmolalidade do plasma foi medida utilizando o micro-osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor, EUA). As concentrações de sódio e potássio foram determinadas em amostras diluídas em água deionizada (1:200) de forma a situarem-se na faixa de leitura (padrão com 150 mM de Na⁺ e 10 mM de K⁺) do método de fotometria de chama (CELM FC-180). As concentrações de cloreto (diluição 1:2) e magnésio (sem diluição em água doce, 1:2 em 10‰, 1:3 em 20‰, 1:5 em 30‰, 1:10 em 35‰ e 1:15 em 40‰) foram dosadas por colorimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech) utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil) com leitura de absorbância em 505 nm (cloreto) e 470 nm (magnésio).

3.4 TEOR HÍDRICO MUSCULAR

Os tubos nas quais foram armazenados os fragmentos de músculos foram previamente pesados em balança analítica. Após a pesagem do tecido descongelado, os mesmos foram desidratados por 24 horas em estufa a 60°C, e pesados (peso seco) em seguida. O cálculo para determinar a porcentagem de água do tecido (Th) se faz pela fórmula: $Th (\%) = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$, onde Pu identifica o peso úmido tecidual, e Ps seu peso seco.

3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.5.1 Anidrase carbônica

A atividade da anidrase carbônica foi determinada segundo método estabelecido por VITALE *et al.* (1999). O tecido foi homogeneizado com o tampão do

ensaio contendo manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. As brânquias foram homogeneizadas em uma proporção de 1:10 de tampão. Para os rins, devido à pequena quantidade de amostra, a homogeneização se fez a partir de um valor constante de 200 µl de tampão. O sobrenadante foi retirado após centrifugação por 5 minutos (9680 xg) à temperatura ambiente. A taxa de reação não catalisada (TNC) foi determinada acrescentando-se a 7,5 ml do tampão, 1 ml de água deionizada saturada com gás carbônico. Esta mistura foi mantida em aproximadamente 4°C pela constante troca de gelo. A partir da colocação da água, observa-se a queda do pH a cada 4 segundos, durante 20 segundos através do pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW, obtendo-se uma reta de regressão linear pH x tempo. A taxa catalisada (TC) pela anidrase carbônica presente nas amostras é determinada pela adição de 50 µl do homogeneizado tecidual, anterior à pipetagem da água saturada. Para calcular a atividade da anidrase carbônica (AAC) utiliza-se a fórmula: $AAC = [(TC/TNC)-1]/\text{mg proteína total}$.

3.5.2 Na⁺,K⁺-ATPase

A atividade da NAK foi determinada segundo McCORMICK (1993), acoplando a hidrólise da Adenosina Tri-fosfato - ATP (ATPase sensível a ouabaína) com a oxidação de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) pela PK (Piruvato Quinase) e LDH (Lactato Desidrogenase). Para a homogeneização, é adicionado 200 µl do tampão SEI (sacarose 250 mM, imidazol 50 mM e Na₂EDTA 10 mM - Ácido Etileno-diaminotetroacético Dissódico) junto a 100 µl de 0.3% SEID (deoxicolato de sódio diluído no tampão), seguido de centrifugação (10480 xg) durante 8 minutos a 4°C. Em microplacas de fundo arredondado com 96 poços cada, faz-se uma curva padrão de NADH e de ADP (Adenosina Di-fosfato), anterior à leitura das amostras, para ajuste da queda na absorbância de NADH com a concentração de ADP, para cálculo da atividade da enzima. Estas curvas são feitas em quadruplicatas, com volume de 10 µl em cada poço. Esta inclinação deve estar em torno de 12 - 17 nmol ADP. O ensaio é cinético e às amostras (10 µl) devem ser adicionadas a 50 µl de solução salina, sendo adicionado em duplicatas, 150 µl da Mistura de Reação (Assay Mixture) sem ouabaína (AM-A) e com ouabaína (AM-B),

respectivamente, para comparar e ter a atividade específica. A concentração final de ouabaína, no poço da placa, é de 0,5 mM. A leitura se faz a 340 nm por 10 minutos. A atividade da bomba é medida pela atividade ATPásica sensível a ouabaína e expressa em $\text{nmol ADP} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.5.3 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados utilizados para todos os ensaios enzimáticos foi determinada utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976), adaptado para microplacas (96 poços) de fundo chato. Utilizaram-se microplacas com leitura em leitor de Elisa (Espectoflorímetro TECAN Infinite M200 SW Magellan V6.5 STD.2PC XP VISTA). O método é baseado na ligação de grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, com leitura feita a 595 nm (MIWA *et al.*, 2008).

3.6 ESTATÍSTICA

Os dados de concentrações plasmáticas, teor hídrico muscular e atividades enzimáticas foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias (Holm-Sidak ou Mann-Whitney) e foram analisados através de ANOVA de uma via para o fator salinidade, uma análise para cada tempo de exposição. A análise estatística das atividades enzimáticas foi feita utilizando os dados das salinidades 0, 10, 20 e 30‰ em 6 e 12 horas devido a mortalidade dos espécimes em salinidades superiores. Testes t de Student foram utilizados para comparar as análises transversais de tempo (6 x 12 horas; 6 x 24 horas e 12 x 24 horas) e atividades enzimáticas entre os tecidos. Não foi possível executar a análise ideal para este protocolo de diferentes salinidades e diferentes tempos, que seria a ANOVA de duas vias, pois houve forte interação entre estes dois fatores: grande mortalidade em 12 ou 24 horas de exposição às salinidades de 30‰ ou acima, portanto, os dados não eram balanceados. O nível de significância foi de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 TESTES PRELIMINARES DE TOLERÂNCIA À TRANSFERÊNCIA ABRUPTA PARA SALINIDADES ELEVADAS

Nos animais expostos por 6 horas a 35 e 40‰ e 12 horas a 30 e 35‰ apresentaram mortalidade, sendo retirados antes do fim do tempo de exposição planejado. Durante a exposição de 6 horas, 50% dos indivíduos em 35‰ morreram, e 50% em 40‰ morreram em aproximadamente 5 horas de exposição. Em 12 horas de exposição, 67% dos peixes em 30‰ morreram em até 9 horas e 55% dos submetidos a 35‰ toleraram até 7 horas. Como esperado, as mesmas salinidades foram 100% letais em 24 horas. Neste tempo, contudo, os animais provavelmente morreram a noite, pois ficaram mortos no fundo do aquário, apresentando muco e coloração opaca quando vistos pela manhã. Sendo assim, não se permite avaliar com segurança seu tempo de morte (FIGURA 08).

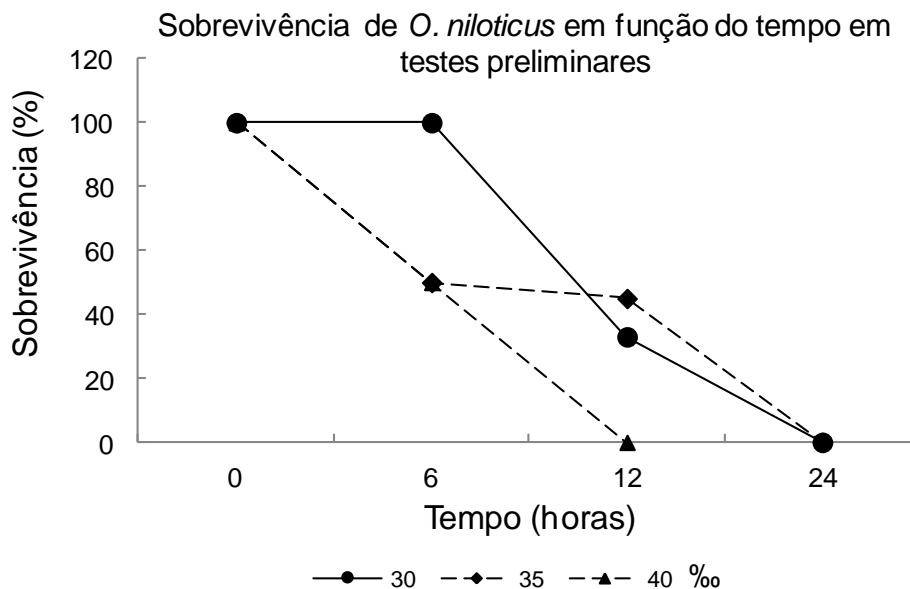


FIGURA 06 - Mortalidade observada nos testes preliminares a transferências abruptas para salinidades mais elevadas (30, 35 e 40‰) em *O. niloticus*, após 6, 12 ou 24 horas de exposição.

4.2 OSMOLALIDADE PLASMÁTICA E TEOR HÍDRICO MUSCULAR

A osmolalidade do plasma da tilápia do Nilo foi de 252 mOsm em água doce, e após 6 horas de exposição aumentou nas salinidades a partir de 10‰ em relação a água doce, com valores superiores a 400 mOsm/kg de H₂O em salinidades superiores a 20‰ (FIGURA 09A). Em 12 horas, a osmolalidade aumentou para valores próximos a 400 mOsm/kg de H₂O em relação a água doce em salinidades superiores a 20‰ (FIGURA 09B), sendo maior que o encontrado em água doce em 20‰, em 24 horas (FIGURA 09C). O teor hídrico muscular na água doce foi de 79%, diminuindo para valores menores que 76% nas salinidades de 30 e 40‰ em 6 horas (FIGURA 09D); nas salinidades maiores que 20‰ em 12 horas (FIGURA 09E) e na salinidade de 20‰ em 24 horas (FIGURA 09F). O teor hídrico foi menor na salinidade 30‰ em 12 horas, e em 20‰ em 24 horas, quando comparado ao primeiro tempo de exposição.

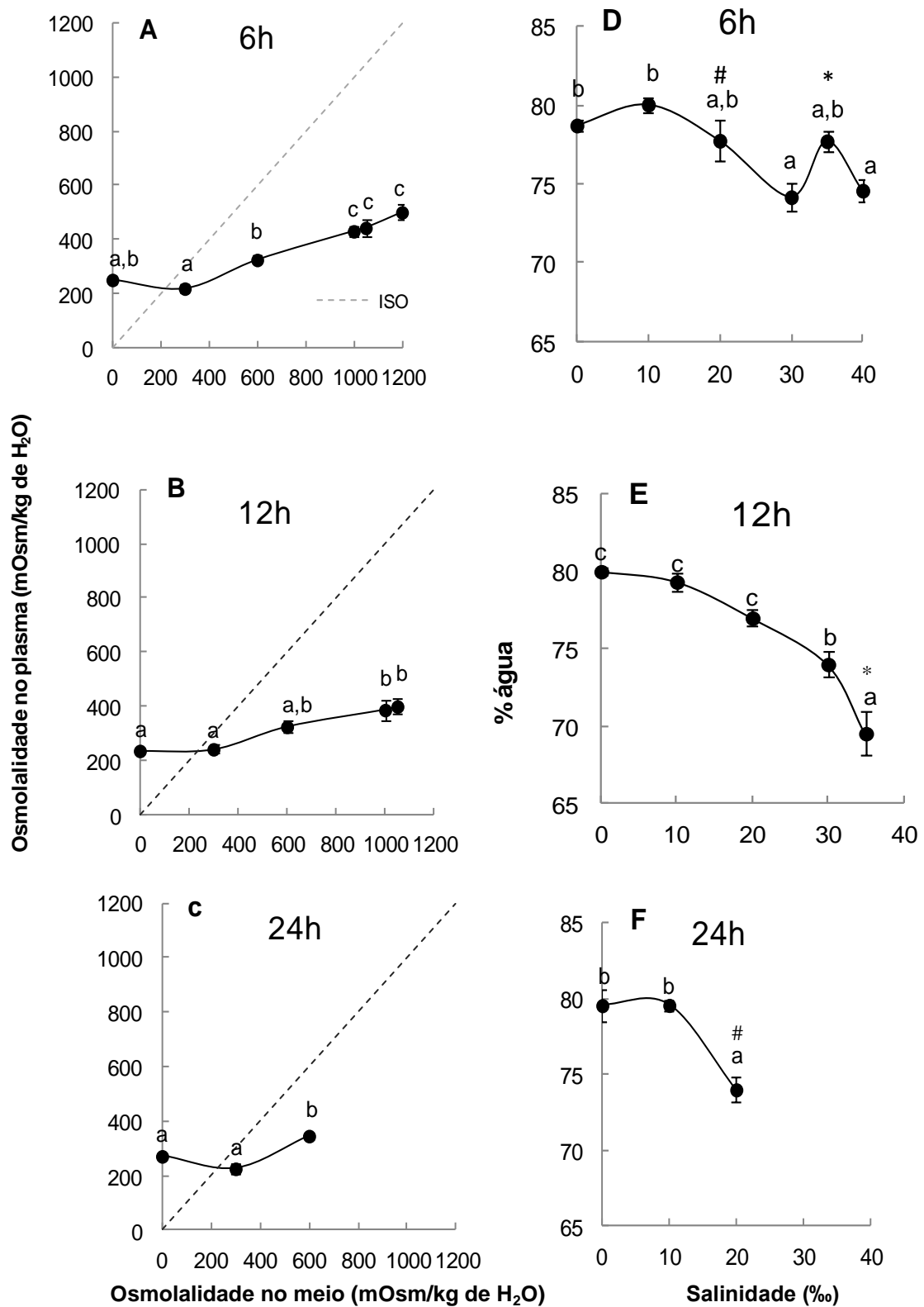


FIGURA 07 - Osmolalidade em (A) 6, (B) 12 ou (C) 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. No eixo "x" está representada a osmolalidade medida nas águas. Teor hídrico em (D) 6, (E) 12 ou (F) 24 horas de exposição às diferentes salinidades. Letras diferentes identificam aumentos da osmolalidade e diminuição do teor hídrico muscular. Ausência de letras em um mesmo gráfico identifica igualdade estatística entre os grupos. (*) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 12 horas. (#) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 24 horas. Não houve diferença na osmolalidade e teor hídrico muscular entre os tempos de exposição de 12 x 24 horas. (4 < n = 9).

4.3 ÍONS PLASMÁTICOS

4.3.1 Sódio e cloreto

A concentração de sódio no plasma, em água doce, foi de 148 mM, mantendo-se regulado em todas as salinidades e tempos de exposição (FIGURA 10A,B e C). A concentração de cloreto foi de 113 mM em água doce, aumentando em relação a estes valores, em 6 horas em 30 e 35‰. Seu pico de concentração foi de 264 mM, na salinidade 35‰ (FIGURA 10D). Ainda em relação a água doce, em 12 horas, a concentração do íon aumentou em 35‰, e seu maior valor foi na salinidade 30‰, de 216 mM (FIGURA 10E). Em 6 horas, o valor da concentração de cloreto em 35‰ foi quase o dobro da concentração em 12 horas de exposição.

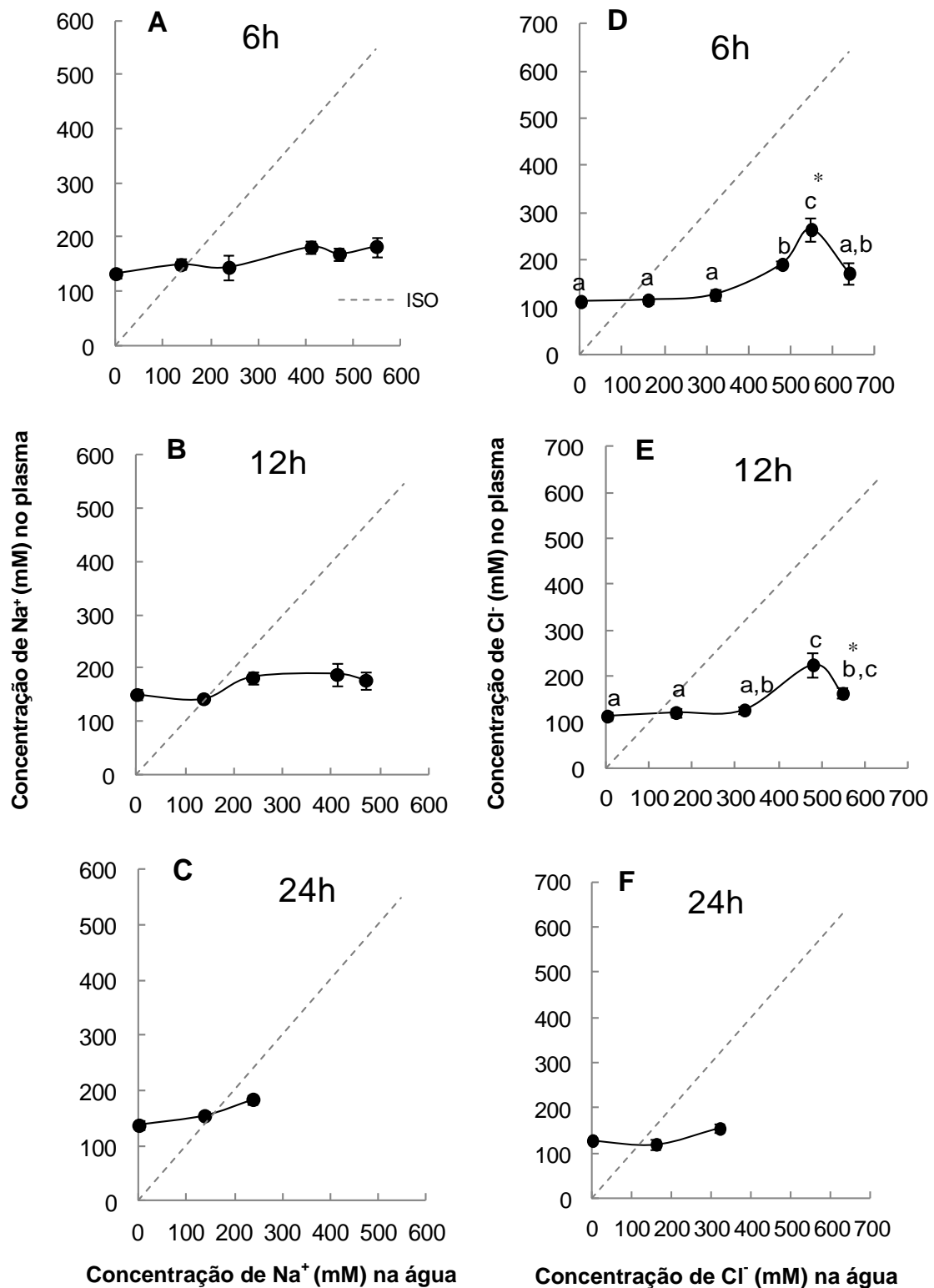


FIGURA 08 - Concentração de Na^+ (mM) plasmático após (A) 6, (B) 12 ou (C) 24 horas de exposição, e de Cl^- (mM) plasmático após (D) 6, (E) 12 ou (F) 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. Letras diferentes identificam diferenças na concentração iônica. Ausência de letras em um mesmo gráfico identifica igualdade estatística entre os grupos. A concentração dos íons sódio e cloreto (mM) nas águas é calculada segundo tabela de composição de água do mar padrão, de PROSSER (1973). (*) Indica diferença entre os tempos de exposição de 6 x 12 horas. Não houve diferença nas concentrações iônicas entre os tempos de exposição de 6 x 24 horas e 12 x 24 horas ($4 < n = 9$).

4.3.2 Potássio e magnésio

A quantidade de potássio no meio extracelular das tilápias dobrou em 35‰ e 40‰ em relação a água doce (4 mM), após 6 horas de exposição (FIGURA 11A), assim como em 30‰ em 12 horas de exposição. Neste tempo, a transferência para 35‰ promoveu o aumento de potássio para 15 mM. Ainda assim, a variabilidade interna de dados não permite evidenciar estatisticamente este aumento (FIGURA 11B).

A concentração de magnésio, em relação a água doce, foi maior em 30‰ em 6 e (FIGURA 11D) 12 horas (FIGURA 11E). Neste tempo, a concentração do íon chegou a ~13 mM, maior valor de magnésio encontrado.

4.4 ENZIMAS

A menor atividade branquial da anidrase carbônica (FIGURA 12A) em 6 horas foi em 30‰. A maior atividade específica da anidrase carbônica renal foi em 10‰, retornando para valores próximos a água doce a partir desta salinidade (FIGURA 12B). Em 6 horas de exposição na água doce, a atividade branquial é maior que a dos rins.

A atividade branquial da bomba NAK (FIGURA 12C) cai de $3,06 \pm 0,7$ nmol de ADP/ μg ptn/hr em 10‰ em 12 horas para $0,09 \pm 0,2$ nmol de ADP/ μg ptn/hr na salinidade 30‰. A atividade renal da bomba NAK não foi alterada com aumentos de salinidade. A atividade renal da bomba NAK, em relação a branquial, foi maior em todas as salinidades expostas, chegando a ser 9 vezes mais alta que a atividade das brânquias em 10 e 20‰ em 24 horas.

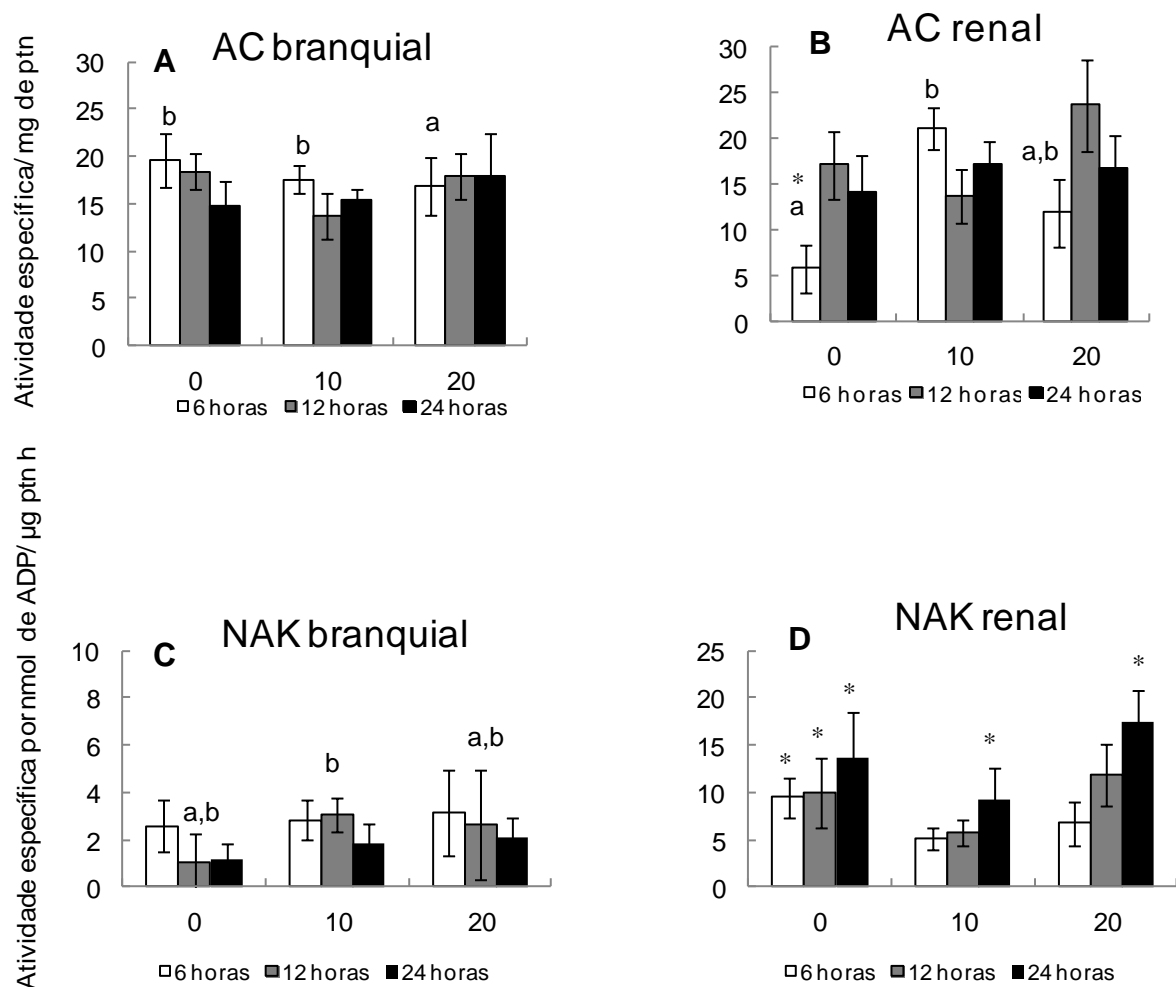


FIGURA 10 - Atividade específica da anidrase carbônica (A) branquial e (B) renal; da bomba NAK (C) branquial e (D) renal após 6, 12 ou 24 horas de exposição a diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35 e 40‰). Ausência de dados indica mortalidade. Letras diferentes identificam aumentos na atividade enzimática. Devido a taxa de mortalidade (50%) dos espécimes, não foi feita análise estatística para 35 e 40‰. (*) Indica diferença entre as atividades de brânquias e rins nos diferentes tempos de exposição e salinidades. (1<n=9).

5. DISCUSSÃO

A primeira medida para se avaliar a tolerância a salinidade de uma espécie pode ser a sobrevivência, que configura a manutenção da homeostasia interna, extra/intracelular. O estresse osmótico caracteriza-se pela desestabilização do equilíbrio osmo-iônico interno, o que leva a perda de água tecidual, conformando

uma fase crítica da espécie (desidratação) que pode acarretar na morte do organismo (WENG *et al.*, 2002). A sobrevivência frente a condições estressantes ou de desafio fisiológico depende também do modelo experimental. Avaliando a tolerância a salinidade de *O. niloticus* nos tempos de exposição de 6,12 ou 24 horas em transferências diretas a aumentos de salinidade, observa-se 100% de sobrevivência em transferências até 20‰. Em outros estudos com tilápia do Nilo a transferência direta para 20‰ de salinidade resultou, após 20 horas, em 20% de mortalidade dos espécimes (NUGON JR, 2003; YAO & AHOUSSE, 2008; SCHOFIELD *et al.*, 2010). Em 30‰ a tolerância máxima da tilápia do Nilo foi de 9 horas, um tempo maior do que o tolerado por *O. mossambicus* (6 horas), mais eurihalina (WENG *et al.*, 2002). A tolerância à exposição direta a água do mar (35‰) de 7 horas, também foi maior do que o identificado por GÜNER *et al.* (2005) em tilápia do Nilo e em *O. mossambicus* (WENG *et al.*, 2002) ou seu híbrido com *O. urolepis* (SARDELLA *et al.*, 2004), que sobreviveram até 4 horas. Em água hipersalina (40‰), a tolerância máxima para a tilápia do Nilo foi de 5 horas. As tilápias do Nilo utilizadas são híbridas com uma linhagem geneticamente modificada para aumentar as taxas de crescimento nos tanques de criação (informação do piscicultor). A taxa de mortalidade de peixes eurihalinos dulcícolas em água do mar pode ser alterada pela hibridização (RUSSELL *et al.*, 2011).

Os resultados permitem observar que a tilápia do Nilo utilizada nos experimentos foi mais tolerante do que observado em outros estudos com a mesma espécie e outras espécies, mesmo mais eurihalinas (*O. mossambicus*), usadas em outros estudos em transferências diretas. Esta tolerância capacita a espécie a utilizar com tranquilidade estuários como pontes para sua dispersão, por serem regiões de água salobra que apresentam uma faixa de salinidade de 0,6 a 29‰ (CONAMA, 2005). Além disso, se cultivada em águas salobras de até 20‰, pode ser capaz de dispersar a outras bacias hidrográficas. A espécie é cultivada nacionalmente em regiões de estuário na Bahia (PERFEITO, 2007). Embora não haja registros de seu cultivo em regiões estuarinas no Estado do Paraná, pode-se discutir que o litoral paranaense é formado por áreas que poderiam se tornar regiões de cultivo da espécie. As baías de Paranaguá e Guaratuba apresentam um regime de salinidade que varia de 3 a 34‰, dependentes do clima e temperatura (JACOBI *et al.*, 1953; MARONE *et al.*, *no prelo*), salinidades toleradas pela espécie. Ainda, é possível perceber que mesmo com um tempo de sobrevivência médio inferior a 12

horas em águas salinas, este tempo pode ser suficiente para que a espécie disperse e até se estabeleça em novos ambientes, dependendo da distância entre os pontos com diferentes salinidades.

A osmolalidade do plasma da tilápia do Nilo, em água doce, foi de 252 mOsm, bem inferior às osmolalidades plasmáticas de 305 mOsm medida na mesma espécie (GUTIERRE, 2011) e de 320 mOsm em *O. mossambicus* (KAMMERER, 2010). Neste estudo, o aumento da osmolalidade plasmática da tilápia do Nilo em transferência a salinidade de 20‰ em 24 horas não foi suficiente para desencadear um estresse osmótico que resultasse em mortalidade dos espécimes. Este aumento contraria a resposta bifásica de aumento de osmolalidade dentro de 6 e 12 horas seguido de recuperação gradual para valores de água doce, dentro de espécies *Oreochromis* (AL-AMOUDI, 1987). A osmolalidade plasmática da tilápia do Nilo em 30‰ aumenta logo após 6 horas, como observado em outro estudo com a mesma espécie (GUTIERRE, 2011). Neste estudo, a osmolalidade plasmática entre 6 e 12 horas em água 35‰ foi de 421 mOsm, menor que 530 mOsm encontrado por AL-AMOUDI (1987) no mesmo período e espécie. Em outras espécies, a exposição abruptas à salinidades iguais ou superiores a 20‰ também promovem aumentos da osmolalidade horas depois da submissão. O retorno para valores próximos de água doce ocorrem em períodos mais longos (semanas) (BATH & EDDY, 1979; HWANG *et al.*, 1989; MORGAN *et al.*, 1997; MORGAN & IWAMA, 1998; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, 2002; SARDELLA *et al.*, 2004; SOUZA-BASTOS & FREIRE, 2009; WANG *et al.*, 2009; KAMMERER *et al.*, 2010). Assim, o possível restabelecimento dos valores encontrados em 20‰ para próximos da água doce, não foi observado. Contudo, percebe-se que a sobrevivência da tilápia do Nilo está relacionada com a manutenção (regulação) da concentração plasmática.

O estresse osmótico em um modelo de animal aquático regulador, na maioria das vezes, é representado pelo aumento da osmolalidade acompanhado da diminuição do teor hídrico. Na tilápia do Nilo, a redução do teor hídrico é observada na transferência a salinidade de 20‰ somente no tempo de exposição de 24 horas, levando um tempo maior para a perda hídrica do que o observado em outros estudos com a mesma espécie, quando a redução é evidenciada em 6 (GUTIERRE, 2011) e 12 horas de exposição (AL-AMOUDI, 1987). Nas salinidades superiores, a redução já é observada após 6 horas de exposição, indicando efeitos do estresse osmótico no animal. Este estresse osmótico é causado pela diferença entre as

concentrações iônicas internas e do meio ambiente (AL-AMOUDI, 1987), e promove letalidades dependentes do tempo de exposição e da resposta individual à variável imposta. Em *O. mossambicus*, *T. nigroviridis* e *C. chanos* a exposição abrupta a águas salobras e salgadas não promovem a redução do teor hídrico (TANG *et al.*, 2009). A manutenção do teor hídrico até 12 horas de exposição acompanha a regulação da concentração plasmática neste mesmo período, confirmando que a tilápia do Nilo é reguladora.

Em água doce, a captação de NaCl é essencial para manter o meio interno hiperosmótico em relação ao ambiente, enquanto em maiores salinidades a diminuição da captação do sal garante a manutenção do meio interno hipoosmótico. Estes íons são também necessários para o funcionamento de transportadores que participam da regulação iônica, como a bomba NAK. Neste experimento, a tilápia do Nilo manteve as concentrações de Na⁺ no seu plasma em todos os tempos de exposição. A regulação dos níveis de Na⁺ pode estar relacionada a contínua atividade da bomba NAK, essencial para equilíbrio das concentrações de Na⁺ e K⁺ extra e intracelulares. Por outro lado, as maiores concentrações do plasma de Cl⁻ em 6 e 12 horas foi evidenciado em 35‰ (6 horas) e em 30‰ (12 horas), salinidades anteriores a salinidade máxima tolerada pelo organismo (40‰ em 6 horas e 35‰ em 12 horas). Em *O. mossambicus* o aumento do nível de Cl⁻ plasmático em água salgada, em 5 horas de exposição, chega a ser maior que o dobro do medido em água doce (WANG *et al.*, 2009), semelhante ao observado em tilápia do Nilo (em 6 horas). As diminuições das concentrações de cloreto nas salinidades máximas toleradas em 6 e 12 horas sugerem a perda da capacidade de regulação do íon, indicando a proximidade do óbito do animal. Isto sugere que a tilápia do Nilo não é capaz de secretar o excesso de íons do seu meio interno. Outras espécies eurihalinas, como *Leucaspis delineatus* e *Pseudorasbora parva* não mantêm seu meio interno hipoosmótico em maiores salinidades, embora tolerem até 4 dias em submissões graduais (SCOTT *et al.*, 2007). A transferência abrupta também pode influenciar nas respostas do organismo frente ao aumento de salinidade, já que o tempo para modular alguma resposta rápida é curto. As mudanças na osmolalidade plasmática e nos níveis de Cl⁻ são os principais indicadores da capacidade dos peixes em regular seus fluidos (GAUMET *et al.*, 1995; PRODOCIMO *et al.*, 2008). Desta forma, é possível dizer que a salinidade afeta principalmente as concentrações de cloreto (ENGEL *et al.*, 1987). O aumento dos íons Na⁺ e Cl⁻ é uma

das causas primárias para o desequilíbrio da manutenção iônica, que resulta em mortalidade (HWANG *et al.*, 1989). Em *Rhamdia quelen* a exposição a 25‰ (SOUZA-BASTOS & FREIRE, 2009) provoca uma resposta semelhante a observada na tilápia do Nilo comparando a razão de Na:Cl, que diminui com aumento dos níveis de cloreto.

Outros íons não menos importantes participam na manutenção iônica. Normalmente, potássio e magnésio são regulados dentro de uma estreita faixa de variação. Enquanto o potássio é importante para a excitabilidade neuronal e muscular (ENGEL *et al.*, 1987) o magnésio é essencial para a absorção e metabolismo de muitos íons, como na captação de Na^+ via trocador apical Na^+/Mg^+ nas células renais do tubo proximal (MARSHALL, 2002). Embora as concentrações de potássio devam ser estritamente reguladas, o desequilíbrio osmo-iônico causa lises celulares que liberam o potássio do meio intracelular. O aumento dos níveis de potássio foi identificado em salinidades superiores a 20‰ em 6 horas e 12 horas (embora a variabilidade interna não permita evidenciar este aumento) - quase o quádruplo da água doce. O mesmo modelo de aumento é observado para os níveis de magnésio, que tem o maior valor em 30‰ (13 vezes maior que em água doce), observado em 12 horas de exposição. Estes aumentos evidenciam um desajuste completo da capacidade de regular as concentrações iônicas da espécie, e possivelmente foram os principais fatores para o estresse osmótico. Poucos estudos mostram as alterações da concentração iônica da tilápia do Nilo exposta a aumentos abruptos de salinidade. Em transferências diretas de água doce a águas de 18‰ os íons sódio e potássio aumentaram 27% (KARSI & YAVUZCAN YLDIZ, 2005).

Quando um peixe dulcícola eurihalino se encontra em ambientes com maiores salinidades, e não consegue secretar o excesso de íons, nem reabsorver água em seu organismo (isto é, não mantém seu meio interno hipoosmótico em relação ao ambiente), observa-se a disfunção de proteínas transportadoras (WENG *et al.*, 2002). Em consequência, os transportadores fundamentais para a manutenção iônica e osmótica contribuem para a mortalidade do animal. A anidrase carbônica, em brânquias de peixes dulcícolas, é fundamental para a captação ativa do sal. A menor atividade das brânquias é observada em 30‰. Esta diminuição da atividade está relacionada com o ambiente a que a tilápia está exposta. Em águas salobras, a captação de sal é desnecessária, pois este tem o influxo passivo, devido suas concentrações externas. Em rins, a enzima desempenha um importante papel na

acidificação luminal, e a consequente diluição da urina (já que a extrusão de prótons é acompanhada pelo efluxo da água), além da reabsorção tubular do sal. O papel da anidrase carbônica, na regulação iônica em água doce, parece ser mais evidente na estrutura branquial (com maior atividade). Em algumas espécies dulcícolas ou anadrômicas, como *P. flesus* e *A. Anguilla*, a exposição a água salgada não altera sua atividade branquial (HASWELL *et al.*, 1983). Em outras, como *O. kisutch*, *O. mossambicus* e *Opsanus beta* a atividade branquial é proporcional ao aumento de salinidade (ZBANYSZECK & SMITH, 1984; KÜLTZ *et al.*, 1992; SATTIN *et al.*, 2010). Portanto, Porém, a redução aguda desta atividade pode influenciar na homeostasia interna do peixe, já que sua atividade participa do balanço ácido-base.

Em ambientes dulcícolas, a bomba NAK branquial permite o transporte do íon Na^+ captado para o plasma. Em ambientes marinhos, internaliza-o, para em sequência ser secretado. Nos rins, tem papel essencial no bombeamento de íons Na^+ para o interior do plasma - permitindo reabsorção do íon. A atividade branquial da NAK na tilápia do Nilo foi menor em 30‰ quando comparada com 10‰. Estes resultados são diferentes dos de outros estudos com tilápia do Nilo, que identificam uma “pré-adaptação” da espécie à salinidades superiores, com aumento da atividade enzimática em salinidades inferiores a 30‰ (GÜNER *et al.*, 2005; YAO & AHOUSSE, 2008). Em *O. mossambicus* transferidas a 25‰ o aumento da atividade branquial da NAK em 12 horas determina um “período de crise” (KAMMERER *et al.*, 2010), não observado para a tilápia do Nilo. O limiar isoosmótico da espécie, determinado por sua menor demanda metabólica - isto é, salinidade com menor atividade das enzimas (NORDLIE, 1978) é identificado nas salinidades de 5-10‰ (TOWLE *et al.*, 1977), também distinto de nossos resultados. A atividade renal da NAK na tilápia do Nilo foi maior que a branquial em todas as salinidades expostas. Esta diferença na atividade da bomba entre os tecidos pode estar relacionada a lugares confinados, que em transferência para salinidades elevadas promove o aumento da atividade renal e diminuição da branquial em aclimações em água do mar (NOLAN *et al.*, 1999). Na tilápia do Nilo, a manutenção da atividade da bomba NAK branquial e renal, em valores próximos da água doce, podem estar relacionadas a importância da proteína para manutenção de íons essenciais para o equilíbrio iônico.

Em diferentes espécies dulcícolas ou anadrômicas, existem resultados conflitantes na análise da atividade enzimática de NAK. Isto pode estar relacionado

aos subtipos celulares, além da diminuição do número - apesar do aumento do tamanho - de células de cloreto em salinidades maiores (HAWKINGS *et al.*, 2004). Ainda, a atividade depende da composição iônica, principalmente na água doce (GAUMET *et al.*, 1995). Um estudo com *O. mykiss* a inibição da bomba não comprometeu processos osmorregulatórios, sugerindo um papel secundário, ou mesmo inexistente de sua atividade na osmorregulação (LEADEM *et al.*, 1974). Em outros estudos para esta (HAWKINGS *et al.*, 2004) e outras espécies, em transferências graduais ou diretas para salinidades superiores a 20‰, é observado um aumento da sua atividade, como em *O. mossambicus* (HWANG *et al.*, 1989; MORGAN *et al.*, 1997; WENG *et al.*, 2002; SARDELLA *et al.*, 2004; KAMMERER, 2010), *A. naccarii* (ALLEN *et al.*, 2009), *T. nigroviridis* (LIN *et al.*, 2004), *Bathygobius soporator* (PIECHNICK, 2006), *A. anguilla*, *S. trutta*, e *F. heteroclitus* (WANG *et al.*, 2009). Este aumento da atividade da bomba em transferências a água salgada pode estar relacionado como uma resposta ao estresse pela mudança da salinidade (HWANG & LEE, 2007) e maior gasto de energia para manter o equilíbrio iônico, quando comparada a água doce (MORGAN & IWAMA, 1998; BOILY *et al.*, 2007). Em *O. mossambicus* também se observa uma diminuição da atividade branquial em água do mar (WANG *et al.*, 2009) e seu aumento na exposição a água deionizada (TANG *et al.*, 2008). A exposição a água doce aumenta a atividade da enzima em *S. salar* (BYSTRIANSKY & SCHULTE, 2011), e *C. auratus*. As atividades altas da enzima em água doce ajudam na compensação da perda de íons (BOILY *et al.*, 2007). Ainda, outros estudos mostram que a transferência para diferentes salinidades não alteram a resposta da bomba NAK branquial em *O. mossambicus* (VAN DER HEIDJEN *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2003; FIESS *et al.*, 2007), *O. kisutch* (MORGAN & IWAMA, 1998) e *Morone saxatilis* (MADSEN *et al.*, 1994). A atividade renal se mostra constante ou diminuída na transferência para água salgada em *M. saxatilis* e *A. naccarii* (MADSEN *et al.*, 1994; ALLEN *et al.*, 2009). Estes diferentes resultados das atividades específicas da anidrase carbônica e da bomba NAK encontrados em várias, ou na mesma espécie não permitem identificar a real participação destas enzimas na osmorregulação.

6. CONCLUSÃO

A tilápia do Nilo é uma espécie reguladora, que tolera transferências abruptas a partir da água doce para águas salobras de salinidade de até 20‰. Este é o primeiro trabalho que integra a avaliação da tolerância da tilápia do Nilo frente transferências abruptas de salinidade, com a análise das atividades enzimáticas da anidrase carbônica e Na^+, K^+ -ATPase branquial e renal. Este grau de eurihalinidade leva à conclusão de que, se a tilápia do Nilo for cultivada em tanques-rede próximos a regiões estuarinas, ela possa utilizar os estuários como pontes de dispersão para outras bacias hidrográficas. Por ser uma espécie invasora, a tilápia do Nilo pode trazer danos à biota nativa. Assim, políticas mitigadoras do controle de escape e a própria utilização de tanques rede em águas doce e/ou salobras para o cultivo deste organismo no Brasil precisam ser reavaliadas.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H. F. Ameaça ecológica: peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 21, pgs. 36-44, 1996.
- AGOSTINHO, A.A. ; PELICICE, F.M ; PETRY, A.C; GOMES, L.C. ; JULIO JUNIOR, H.F. . Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v. 10, pgs. 174-186, 2007.
- AL-AMOUDI, M.M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water – an experimental study. **Aquaculture**. v. 65, pgs. 333-342, 1987.
- ALLEN, P.J.; CECH JR., J.J.; KÜLTZ, D. Mechanisms of seawater acclimation in a primitive, anadromous fish, the green sturgeon. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, pgs. 903-920, 2009.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Aquicultura e pesca: situação atual, 2005. Disponível em <<http://www.ana.gov.br/pnrh/documentos>>. Acesso em março de 2012.
- ANDRADE, R.L.B; WAGNER, R.L.; MAHL, I.; MARTINS, R.S. Custos de produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em um modelo de propriedade da região oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, 2005.

AQUAPORTO. A evolução da piscicultura. Disponível em <<http://www.aquaporto.com.br/tilapia/>>. Acesso em julho de 2009.

ARTHUR, R.I.; LORENZEN, K.; HOMEKINGKEO, P.; SIDAVONG, K.; SENGVILAIKHAM, B.; GARAWAY, C.J. Assessing impacts of introduced aquaculture species on native fish communities: Nile tilapia and major carps in SE Asian freshwaters. **Aquaculture**, v. 299, pgs. 81–88, 2010.

ATTAYDE, J.L.; OKUN, N.; BRASIL, J.; MENEZES, R.; MESQUITA, P. Impactos da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos do Bioma Caatinga. **Oecologia Australis**, v. 11, 2007.

AYROZA, L.M.S. **Criação de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR.** (Tese). Universidade Estadual Paulista, 104 p., 2009.

AYSON, F.G.; KANEKO, T.; TAGAWA, M.; HASEGAWA, S.; GRAU, E.G.; NISHIOKA, R.S.; KING, D.S.; BERN, H.A.; HIRANO, T. Effects of acclimation to hypertonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactins and growth hormone in two species of tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. **General Comparative Endocrinology**, v. 89, pgs. 138-148, 1993.

BARRETO, R.E.; ARANTES CARVALHO, G.G.; VOLPATO, G.L. The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment. **Zoology**, v. 114, n. 1, pgs. 53-57, 2011.

BATH, R.N.; EDDY, F.B. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from freshwater to seawater. **Journal of Experimental Biology**. v. 83, pgs. 193-202, 1979.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas**. 4ªed, Artmed, Porto Alegre, 2007.

BIZERRIL, C.R.S.F.; PRIMO PBS. **Peixes de Águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro**. PLANAGUA – FEMAR/SEMADS, Rio de Janeiro, 2001.

BOILY, P.; REES, B.B.; WILLIAMSON, L.A.C. Vertebrate osmoregulation: a student laboratory exercise using teleost fish. **Advances in Physiology Education**, v. 31, pgs. 352–357, 2007.

BYSTRIANSKY, J.S.; SCHULTE, P.M. Changes in gill H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **The Journal of Experimental Biology**. v. 214, pgs. 2435-2442, 2011.

CALDAS, M.E.M.R. Criação racional de peixes. CEPLAC (Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira). Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo14.htm>>. Acesso em março de 2012.

CARDOSO, M.M.L. **Efeitos de peixes zooplantívoros e onívoros sobre a resposta de comunidades planctônicas à fertilização por nutrientes**. (Dissertação), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

CASAL, C.M.V. Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action. **Biological Invasions**, EUA, v. 8, pgs. 3-11, 2006.

CHAKRABARTY, P. Cichlid biogeography: comment and review. **Fish and Fisheries**, v. 5, pgs. 97-119, 2004.

CHANG, I.C.; HWANG, P.P. Cl⁻ uptake mechanism in freshwater adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, pgs. 406-414, 2004.

CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales de São Francisco e do Parnaíba. **Manual de Criação de Peixes em Tanques-Rede**. Brasília, 2010. Disponível em: www.codevasf.gov.br. Acesso em março de 2012.

COLLARES-PEREIRA, M.J.; COWX, I.G. The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. **Fisheries Management and Ecology**, v. 11, pgs. 303-312, 2004.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf>. Acesso em março de 2012.

DA SILVA, L.A.C. Análise de Investimento em piscicultura: produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede. Apresentação oral. SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Grupo de Pesquisa: Agropecuária, Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/13/242.pdf>>. Acesso em março de 2012.

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Emater-MG estimula criação de tilápias em cativeiro. Disponível em <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=7090>. Acesso em março de 2012.

ENCARNACIÓN LOZANO, A.G.S.; ZALDÍVAR-RIVERÓN, A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. **Genetica**, v. 136, pgs. 479-490, 2009.

ENGEL, D.W.; HETTLER, W.F.; COSTON-CLEMENTS, L.; HOSS, D.E. Effects of abrupt salinity changes on the osmoregulatory abilities of the Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 86A, pgs. 723-727, 1987.

EVANS, D.H. **The Physiology of Fishes**. CRC Press, Boca Raton, USA, 1993.

EVANS, D.H. Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 76, pgs. 1903-1925, 2010.

EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M.; CHOE, KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, pgs. 97-177, 2005.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; POTTS, W.T.W. Ionic transport in the fish gill epithelium. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 283, pgs. 641-652, 1999.

FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em setembro de 2006.

FERREIRA, R.A.R.; CAVENAGHI, A.L.; VALINI, E.D.; CÔRREA, M.R.; NEGRISOLI, E. *et al.* Monitoramento de fitoplâncton e microcistina no reservatório da UHE Americana. **Planta Daninha**, v. 23, pgs. 203-214, 2005.

FISS, J.C.; KUNKEL-PATTERSON, A.; MATHIAS, L.; RILEY, L.G.; YANCEY, P.H.; HIRANO, T.; GRAU, E.G. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, pgs. 252-264, 2007.

FIGUEIREDO JR, C.A.; VALENTE JR, A.S. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Grupo de Pesquisa: Comercialização, Mercado e Preços, 2008. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/9/178.pdf>>. Acesso em março de 2012.

FLORES-LOPES, F; THOMAZ, A.T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, pgs. 179-188, 2011.

FOSKETT, J.K.; SCHEFFEY, C. The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. **Science**, v. 215, pgs. 164-166, 1982.

FREIRE, C.A.; AMADO, EM.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M.; PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, pgs. 435-446, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase versão 4/2007. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em maio de 2007.

FULLER, P.L.; NICO, L.G.; WILLIAMS, J.D. **Nonindigenous fishes introduced into inland waters of the United States**. American Fisheries Society, Bethesda, 613 pgs., 1999.

FURLANETTO, F. P. B.; AYROZA, D. M. M. R.; AYROZA, L. M. S. Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis* spp.) em tanque-rede no médio Paranapanema, Estado de São Paulo, safra 2004/05. **Informações Econômicas**, v.36, 2006.

GARCÍA-BERTHOU, E.; ALCARAZ, C.; POU-ROVIRA, Q.; COENDERS, G.; FEO, C. Introduction pathways and establishment rates of invasive species in Europe. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 62, pgs. 453–463, 2005. .

GAUMET, F.; BOEUF, G.; SEVERE, A.; LE ROUX, A.; MAYER-GOSTANT. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. **Journal of Fish Biology**. v. 47, pgs. 865-876, 1995.

GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 1647-1661, 2009.

GOVERNO DE MINAS GERAIS. **Estudo Técnico-Científico visando a delimitação de parques aquícolas nos lagos das usinas hidroelétricas de Furnas e Três Marias – Relatório de Estudos Ambientais e Regularização do Parque Aquícola Guapé-4, Reservatório de Furnas**, 2007. Disponível em: <http://ecologia.icb.ufmg.br/~rpcoelho/Parques_Aquicolas/website/pdfs/relatorios_seap/eia_santo_hilario.pdf>. Acesso em fevereiro de 2012.

GÜNER, Y.; ÖZDEN, O.; ÇAGIRGAN, H.; ALTUNOK M.; KIZAK, V. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 29, pgs. 1259-1266, 2005.

GUTIERRE, S.M.M. **Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas**. (Dissertação) Universidade Federal do Paraná, 73 p., 2011.

HASWELL, M.S.; RAFFIN, J-P.; LeRAY, C. (1983) An investigation of the carbonic anhydrase inhibitor in eel plasma. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, pgs. 175–177, 1983.

HAWKINGS, G.S.; GALVEZ, F.; GOSS, G.G. Seawater acclimation causes independent alterations in Na⁺/K⁺ and H⁺-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 905-912, 2004.

HEIN, G.; BRIANESE, R.H. Modelo Emater de produção de tilápia. EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural, 2004. Disponível em <http://www.emater.pr.gov.br/arquivos/File/Comunicacao/Premio_Extensao_Rural/1_Premio_2005/ModeloEmaterProd_Tilapia.pdf>. Acesso em março de 2012.

HENRY, R.P. Multiple functions of gill carbonic anhydrase. **Journal of Experimental Zoology**. v. 248, pgs. 19–24, 1988.

HIROI, J.; KANEKO, T.; TANAKA, M. *In vivo* sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, pgs. 3485–3495, 1999.

HORNG, J-L.; HWANG, P-P; SHIH, T-H.; WHEN, Z-H.; LIN, C-S.; LIN, C-Y. Chloride transport in mitochondrion-rich cells of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. **American Journal of Physiology**, v. 297, pgs. C845-C854, 2009.

HWANG, P-P. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 1745-1752, 2009.

HWANG, P.P.; FANG, M.J.; TSAI, J.C.; HUANG, C.J.; CHEN, T.S. Expression of mRNA and protein of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 18, pgs. 363-373, 1998.

HWANG, P-P.; LEE, T-H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 148, pgs. 479-497, 2007.

HWANG, P.P.; LEE, T-H.; LIN, L-Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, pgs. R28-R47, 2011.

HWANG, P-P.; SUN, C-M.; WU, S-M. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. **Marine Biology**, v. 100, pgs. 295-299, 1989.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em março de 2012.

IGARASHI, M.A. Piscicultura. CREA – Conselho Regional de Engenharia, Aquicultura e Economia. Série de Cadernos da Agenda Parlamentar, 2011. Disponível em <www.crea-pr.otg.br>. Acesso em março de 2012.

JACOBI, H. Sobre a distribuição da salinidade e do pH na Baía de Guaratuba. **Arquivos do Museu Paranaense**. v.10, pgs., 3-35, 1953.

JOBLING, M. **Environmental Biology of Fishes**. Chapman e Hall, London, 1995.

KAMMERER, B. D.; CECIL JR., J. J.; KÜLTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 157, pgs. 260–265, 2010.

KARSI, A.; YAVUZCAN YILDIZ, H. Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. **Tarım Bilimleri Dergisi**, v. 11, pgs. 139-141, 2005.

KOLAR, C.S.; LODGE, D.M. Ecological predictions and risk assessment for alien fishes in north america. **Science**, v. 298, pgs. 1233-1236, 2002.

KUBITZA, F. Tilápia em água doce e salgada. **Revista Panorama de Aquicultura**, v. 15, 2005.

KÜLTZ, D.; BASTROP, R.; JÜRSS, K.; SIEBERS, D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na⁺/ K⁺ - ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 102, pgs. 293-301, 1992.

LEADEM, T.P, CAMPBELL, R.D., JOHNSON, D.W. Osmoregulatory responses to ddt and varying salinities in *Salmo gairdneri* - I. Gill Na-K-ATPase. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 49, pgs. 197-205, 1974.

LEE, T-H.; FENG, S-H.; LIN, C-L.; HWANG, Y-H.; HUANG, C-L.; HWANG, P-P. Ambient salinity modulates the expression in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Science**. v. 20, pgs. 29-36, 2003.

LEMARIÉ G., BAROILLER, J.F. ; CLOTA, F. ; LAZARD, J. DOSDAT, A. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. **Aquaculture**, v. 240, pgs. 575-584, 2004.

LIMA JR, D.P.; AGOSTINHO, A.A; BINI, L.M.; HOEINGHAUS, D.J. **Da ecologia às políticas públicas...o que as espécies não nativas tem a nos ensinar?** (Tese), Ciências Ambientais, Universidade Estadual de Maringá, 85 p. 2012.

LIN, C.H.; TSAI, C.H.L.; LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 138, pgs. 287-295, 2004.

MADSEN, S.S; McCORMICK, S.D.; YOUNG, G.; ENDERSEN, J.S. Physiology of seawater acclimation in the striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 13, pgs. 1-11, 1994.

MAETZ, J., ROMEU, F.G. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fresh-water fish, *Carassius auratus*. II. Evidence for $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanges. **The Journal of General Physiology**, v. 47, 1964.

MAGALHÃES, A.L.B.; BRITO, M.F.G.; ANDRADE, R.F. Espécies introduzidas. *In*: Uma abordagem didático-científica sobre peixes introduzidos no Estado de Minas Gerais. Disponível em <<http://www.exoticfish.bio.br>>. Acesso em agosto de 2005.

MAGALHÃES, A.L.B. ; CASATTI, L.; VITULE, J.R.S. Alterações no Código Florestal Brasileiro favorecerão espécies não-nativas de peixes de água doce. **Natureza & Conservação**, v. 9, pgs. 121-124, 2011.

MALLASEN, M.; BARROS, H.P.; YAMASHITA, E.Y. Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade da água. Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária, 2008. Disponível em: APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios)< www.apta.sp.gov.br>. Acesso em março de 2012.

MARONE, E.; MACHADO, E.C.; LOPES, R.M.; DA SILVA, R.T. Land-ocean fluxes in the Paranaguá Bay Estuarine system, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 53, pgs. 169-181, 2005.

MARONE, E.; MANTOVANELLI, A.; NOERNBERG, M.A.; KLINGUENFUSS, M.S.; PRATA JR, V.P. Dinâmica da Baía de Paranaguá, *no prelo*.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 3699–3706, 2002.

MARSHALL, W.S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 293, pgs. 264–283, 2002.

MARSHALL, W.S. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1618, pgs. 95–105, 2003.

MARSHALL, W.S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans DH & Claiborne JB (Eds). **The Physiology of Fishes**, Taylor & Francis, 561 p., 2006.

MARSHALL, W.S.; HOWARD J.A.; COZZI, R.R.; LYNCH, E.M. NaCl and fluid secretion by intestine of teleost *Fundulus heteroclitus*: involvement of CFTR. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 745 –758, 2002a.

MARSHALL, W.S.; LYNCH, E.M.; COZZI, R.R.F. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 1265 – 1273, 2002b.

MATEO, D.; RIZA, A.; CAMPOS, W.; KATALBAS, M.S.F.; SANARES, R. EDRA, R.; CHEVASSUS, B.; LAZARD, J.; MORISENS, P.; BAROILLER, J.F.; ROGNÓN, X. Salinity tolerance of *Oreochromis niloticus* and *O. mossambicus* F1 hybrids and their successive backcross. Disponível em: <<http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/ista6/ista6web/pdf/426.pdf>>. Acesso em junho de 2011

McCORMICK, S.D. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na^+ , K^+ -ATPase activity. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, pgs. 656-658, 1993.

McCORMICK, S.D. Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. In: Wood CM & Shuttleworth TJ (Eds). **Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation**. Fish Physiology series, Academic Press, San Diego, v. 14, pgs. 285-315, 1995.

McCORMICK, S.D.; REGISH, A.M.; CHRISTENSEN, A.K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na^+ / K^+ -ATPase in gill chloride cells of *Atlantic salmon*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 3994-4001, 2009.

McNEELY, A.J. An introduction to human dimensions of invasive alien species, p. 5-20. In: _____. **The Great Reshuffling: Human Dimensions of Invasive Alien Species**. IUCN – The World Conservation Union, Switzerland and Cambridge, Gland, 2001.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. Lipídeos na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, pgs. 566-573, 2002.

MIWA, A.C.P.; FALCO, P.B.; CALIJURI, M.C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, pgs. 236-242, 2008.

MONTEIRO, S.M.; OLIVEIRA, E.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; SOUZA, M. Fine structure of the branchial epithelium in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Journal of Morphology**, v. 271, pgs. 621–633, 2010.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na^+ , K^+ -ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. **Journal of Fish Biology**. v. 53, pgs. 1110- 1119, 1998.

MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**. v. 117, pgs. 391-398, 1997.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. The University of Alberta, Canada, 624p. , 2006.

NOLAN, D.T.; OP'T VELD, R.L.J.M.; BALM, P.H.M.; BONGA, S.E. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement. **Aquaculture**, v. 177, pgs. 297-309, 1999.

NORDLIE, F.G. The influence of environmental salinity on respiratory oxygen demands in the euryhaline teleost, *Ambassis interrupta* Bleeker. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 59A, pgs. 271-274, 1978.

NUGON JR, R.W. **Salinity tolerance of juveniles of four varieties of tilapia**. (Tese), Louisiana State University and Aquaculture and Mechanical College, 76 p., 2003.

OGUTU-OHWAYO, R. The decline of the native fishes of Lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticus* and the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 27, pgs. 81–96, 1990.

ORSI, M.L.; AGOSTINHO, A.A. Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da bacia do rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, pgs. 557-560, 1999.

OUATTARA, N'G.; BODINIER, C.; NÈGRE-SADARGUES, G.; D'COTTA, H.; et al., 2009. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. **Aquaculture**, v. 290, pgs. 155-164, 2009.

PERFEITO, G. Cultivo de tilápias estuarinas melhora a vida de comunidades na Bahia, 2007. Disponível em <http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=323&cod=6316476&indice=50>. Acesso em abril de 2012.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v. 59, pgs. 325-347, 1997.

PERRY, S.F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYAA, M.; FUROMSKY, M.; THOMAS, S.L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 300A, pgs. 53–62, 2003.

PIECHNIK, C.A. **Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e alterações histológicas nas brânquias do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) após exposição a diferentes salinidades.** (Dissertação). Biologia Molecular e Celular. Universidade Federal do Paraná, 2006.

PISAM, M., AUPERIN, B.; PRUNET, P.; RENTIER-DELRUE, F.; MARTIAL J.; RAMBOURG, A. Effects of prolactin on α and β chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia "*Oreochromis niloticus*". **The Anatomical Records**, v. 235, pgs. 275-284, 1993.

PISAM, M.; CAROFF, A.; RAMBOURG, A. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. **American Journal of Anatomy**, v. 179, pgs. 40-50, 1987.

PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, pgs. 243-253, 2001.

PRODOCIMO, V.; GALVEZ, F.; FREIRE, C.A.; WOOD, C.M. Unidirectional Na⁺ and Ca²⁺ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, pgs. 519-528, 2007.

PRODOCIMO, V.; SOUZA, C.F.; PESSINI, C.; FERNANDES, L.C.; FREIRE, C.A. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon shortterm salinity reduction. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, pgs. 613-620, 2008.

PROSSER, C.L. **Comparative Animal Physiology**, 3rd ed. W.B Saunders Co. Philadelphia, 1973.

PULLIN, R.S.V.; LOWE-McCONNELL, R.H. (Eds.). **The Biology and Culture of Tilapia.** ICLARM Conference Proceedings, Filipinas, 1982.

RUSSELL, D.J.; THUESEN, P.A. & THOMSON, F.E. A review of the biology, ecology, distribution and control of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) (Pisces: Cichlidae) with particular emphasis on invasive Australian populations. **Review in Fish Biology and Fisheries**, 2011. DOI 10.1007/s11160-011-9249-z.

SABBAG, O.J.; ROZALES DOS R., R. TARSITANA, M.A.A.; SILVEIRA A.N. Análise econômica da produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em um modelo de propriedade associativista em Ilha Solteira/SP. **Custos e Agronegócios on line**, v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <www.custoseagronegocioonline.com.br>. Acesso em março de 2012.

SAKAMOTO, T.; KOZAKA, T.; TAKAHASHI, A.; KAWAUCHI, H.; ANDO, M. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. **Aquaculture**, v. 193, pgs. 347-354, 2001.

SANTOS, L.D.; ZARA, R.F.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N.E.; FRANCO, M.L.R.S. Avaliação sensorial e rendimento de filés defumados de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757) na presença de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, 2007.

SARDELLA, B.A.; MATEY, V.; COOPER, J.; GONZALEZ, R.J.; BRAUNER, C.J. Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in 'California' Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, pgs. 1399-1413, 2004.

SATTIN, G.; MAGER, E.M.; BELTRAMINI, M.; GROSELL, M. Cytosolic carbonic anhydrase in the Gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology a-molecular & integrative**, v. 156, pgs. 169-175, 2010.

SCHOFIELD, P.J.; PETERSON, M.S.; LOWE, M.R.; BROWN-PETERSON, N.J.; SLACK, W.T. (2010) Effects of temperature and salinity on survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) established in southern Mississippi, USA. Disponível em: http://fi.biology.usgs.gov/projects/tilapia_salinity.html. Acesso em dezembro de 2011.

SCOTT, D.M.; RABINEAU, J.; WILSON, R.W.; HODGSON, D.J.; BROWN, A. Can pikeperch colonise new freshwater systems via estuaries? Evidence from behavioural salinity tests. **Marine and Freshwater Research**, v. 58, pgs. 694-702, 2008.

SCOTT, D.M.; WILSON, R.W.; BROWN, A. Can sunbleak *Leucaspis delineates* or topmouth gudgeon *Pseudosbora parva* disperse through saline waters? **Journal of Fish Biology**, v. 71, pgs. 70-86, 2007.

SEBRAE – Serviço de Apoio às Pequenas e Micro Empresas. Aquicultura e pesca: Tilápias – Estudo de mercado SEBRAE/ESPM, 2008. Disponível em <http://www.gipescado.com.br/arquivos/sebrae_tilapia.pdf>. Acesso em março de 2012.

SEBRAE – Serviço de Apoio às Pequenas e Micro Empresas. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/setor/aquicultura-e-pesca>>. Acesso em março de 2012.

SENDER, S.; BÖTTCHER, K.; CETIN, Y.; GROS, G. Carbonic anhydrase in the gills of seawater-and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 1, pgs. 43-50, 1999.

SOUZA-BASTOS, L. R., FREIRE, C. A. The Handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 289, pgs. 167-174, 2009.

SUSSEL, F.R. A tilapia vem se ajustando a novos cenários e regiões, 2010. ANUALPEC – Anuário de Pecuária Brasileira. Disponível em <<http://www.abracoa.com.br/0608/0608.pdf>>. Acesso em março de 2012.

TANG, C.H.; CHANG, I.C.; CHEN, C.H. et al. Phenotypic changes in mitochondrion-rich cells and responses of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of tilapia exposed to deionized water. **Zoological Sciences**, v. 25, pgs. 205-211, 2008.

TANG, C-H.; TZENG, C-S.; HWANG, L-Y.; LEE T-H. Constant muscle water content and renal HSP90 expression reflect osmotic homeostasis in euryhaline teleosts acclimated to different environmental salinities. **Zoological Studies**, v. 48, pgs. 435-441, 2009.

TAYLOR, J.N.; COURTENAY JR., W.R.; McCANN, J.A. Known impacts of exotic fishes in the continental United States. In: COURTENAY JR., W.R.; & STAUFFER, J.R. (Eds.), **Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 430 p., 1984.

TEIXEIRA, V. Iniciativas públicas e privadas vão garantir o aumento de 400% da produção de peixes no Acre, 2011. Disponível em <<http://www.agencia.ac.gov.br/index.php/noticias/especiais/17500-iniciativas-publicas-e-privadas-irao-garantir-o-aumento-de-400-da-producao-de-peixes-no-acre.html>>. Acesso em março de 2012.

TOWLE, D.W.; GILMAN, M.E.; HEMPEL, J.D. Rapid modulation of gill Na⁺ + K⁺-dependent ATPase activity during acclimation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to salinity change. **Journal of Experimental Zoology**. v. 202, pgs. 179-186, 1977.

UCHIDA, K.; KANEKO, T.; MIYAZAKI, H.; HASEGAWA, S.; HIRANO, T. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. **Zoological Science**, v. 17, pgs. 149-160, 2000.

UCHIDA, K.; KANEKO, T.; KOHEI, Y.; HIRANO, T. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. **Journal of Experimental Zoology**, v. 276, pgs. 193- 200, 1996.

VAN DER HEIDJEN, A.J.H.; VERBOST, P.M.; EYGENSTEYN, J.; BONGA, S.E.W.; FLICK G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to freshwater or seawater: quantification by confocal laser scanning microscopy. **The Journal of Experimental Biology**. v. 200, pgs. 55-64, 1997.

VILLEGAS, C.T. Evaluation of salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, and their F1 hybrids. **Aquaculture**, v. 85, n. 281, pgs. 282, 287, 1990.

VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122C, pgs. 121-129, 1999.

VITULE, J.R.S. **Distribuição, abundância e estrutura populacional de peixes introduzidos no rio Guaraguaçu, Paranaguá, Paraná, Brasil**. Tese (Doutorado em Zoologia) – departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VITULE, J.R.S. Introdução de espécies, com ênfase em peixes de ecossistemas continentais. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, pgs. 111-122, 2009.

VITULE, J.R.S.; FREIRE, C.A.; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. **Fish and Fisheries**, v. 10, pgs. 98–108, 2009.

WANG, P-J.; LIN, C-H.; HWANG, L-Y.; HUANG, C-H.; LEE, T-H.; HWAG, P.P. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 152, pgs. 544-551, 2009.

WATANABE, W.O.; KUO, C-M.; HUANG, M-C. Salinity tolerance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities. **Aquaculture**, v. 48, pgs. 159-176, 1985.

WENG, C-F.; CHIANG, C-C.; GONG, H-Y.; CHEN, M. H-C.; LIN, C. J-F.; HUANG, W-T.; CHENG, C-Y.; HWANG, P.P.; WU, J-L. Acute changes in gill Na⁺-K⁺-ATPase and creatine kinase in response to salinity changes in the euryhaline teleost, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, pgs. 29–36, 2002.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p., 2005.

WOOD, C.M.; PÄRT, P. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, pgs. 1047-1059, 1997.

ZADUNAISKY, J.A. Chloride cells and osmoregulation. **Kidney International**, v. 49, pgs. 1563-1567, 1996.

ZAMBRANO, L. Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 63, pgs. 1903-1910, 2006.

ZBANYSZECK, R.; SMITH, L.S. Changes in carbonic anhydrase activity in coho salmon smolts resulting from physical training and transfer into seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 79, pgs. 229-233, 1984.

YAO K., AHOUSSEI, A.F.A.; Survie du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en eaux salées durant un transfert direct et progressif. **Livestock Research for Rural Development**, v. 20, 2008.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 550

CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

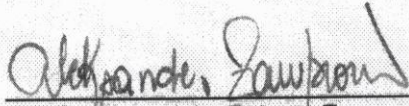
PROCESSO: 23075.081084/2011-67

APROVADO: 07/06/2011 – R.O. 05/2011

TÍTULO: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a aumentos de salinidade abruptos: osmolalidade, teor hídrico, Na,K-ATPase e anidrase carbônica

AUTORES: Carolina Arruda de Oliveira Freire, Fátima Juliane Machado Ceron

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA